

**Beiträge zur Struktur des Sklerotins
und zum Chemismus der Sklerotisierung**

München 1964

Wolfgang Laufer



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Beiträge zur Struktur des Sklerotins
und zum Chemismus der Sklerotisierung**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der
Doktorwürde

der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wolfgang Laufer
Sofia/Bulgarien

München 1964

Referent: Prof. Dr. A. BUTENANDT
Dekan: Prof. Dr. H. MERXMÜLLER

Tag der mündlichen Prüfung: 19.2.1964



MEINEN ELTERN
IN DANKBARKEIT GEWIDMET

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Professor Dr. Peter Karlson im Physiologisch-chemischen Institut der Universität München in der Zeit vom Januar 1959 bis April 1962 durchgeführt.

Herrn Professor Dr. A. Butenandt bin ich für die Aufnahme in seinem Arbeitskreis und die wohlwollende Förderung meiner Arbeit zu herzlichem Dank verpflichtet.

Herrn Professor Dr. P. Karlson danke ich herzlich für sein stetes Interesse und grosszügige Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Dr. G. Braunitzer danke ich für die Durchführung der Aminosäureanalysen.

GLIEDERUNG

A) EINLEITUNG

1. Strukturelle Zusammensetzung und histologische Differenzierung der Dipteren-Cuticula vor und nach der Puparisierung
2. Hormonale Regulation
3. Chinongerbung unter der Wirkung des Phenoloxydasesystems
4. Ziel der Arbeit

B) ALLGEMEINER TEIL

- I. Struktur und Chemismus der Insektencuticula
 1. Chemische Zusammensetzung und physikalische Molekularstruktur
 2. Untersuchung der Chitinkomponente
 3. Untersuchung der Proteinkomponente
 4. Phenolische Substanzen in der Cuticula und ihre Bedeutung für die Sklerotisierung und Melanisierung
 5. Modellversuche und Theorien über Bindungsmöglichkeiten zwischen Chinonen und Proteinen
 6. Spezifität der Phenoloxidasen aus Insekten
 7. Einbauversuche radioaktiv markierter Vorstufen
- II. Eigene Ergebnisse der Untersuchungen zur Struktur und zum Chemismus der sklerotisierten Cuticula von *Calliphora erythrocephala*
 1. Qualitativer und quantitativer Aufbau der Calliphoracuticula als Ausgangspunkt eigener Untersuchungen
 2. Untersuchungen des Cuticula-Proteins
 3. Untersuchung des Chitins
 4. Änderung der chemischen Zusammensetzung der Calliphoracuticula durch die Puparisierung
 5. Quantitative Verteilung von radioaktivem Tyrosin nach der Puparisierung
 6. Untersuchung auf radioaktive phenolische Substanzen
 7. Untersuchung weisser Vorpuppen von *Calliphora*
 8. Reduktive alkalische Hydrolyse
 9. Fraktionierungsversuche der Hydrolysate brauner Puparien
 10. Extraktionsversuche an Puparien: Radioaktivitätsverteilung und Änderung der Zusammensetzung

11. Isolierung einer stark radioaktiv angereicherten Proteinfraktion aus abgeworfenen Puparien von *Caliphora*
12. Methylierung von alkalischen Cuticulaextrakten
13. Acetylierungs- und Diazotierungs-Versuch von alkalischen Cuticulaextrakten
14. Oxydationsversuche von alkalischen Cuticulaextrakten
15. Reduktion von alkalischen Cuticulaextrakten
16. Hydroxylierung alkalischer und saurer Cuticulaextrakte
17. Hydroxylierung der radioaktiven, im Startpunkt verbleibenden Substanzen
18. Hydroxylierung abgeworfener Puparien

III. Diskussion der Ergebnisse

1. Hochmolekulare Strukturbildner der Cuticula
2. Die Sklerotisierungssubstanzen
3. Die sklerotisierte Cuticula
4. Der Sklerotisierungsprozess

C) EXPERIMENTELLER TEIL

1. Einbauversuche
2. Extraktionen
3. Hydrolysen
4. Dialyse
5. Papierchromatographie
6. Verwendete Apparate
7. Stickstoff-, Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmungen
8. Säulenchromatographie
9. Methylierung
10. Acetylierung
11. Oxydation
12. Reduktion
13. Hydroxylierung

D) ZUSAMMENFASSUNG

E) LITERATURVERZEICHNIS

A) EINLEITUNG

Unter den heute üblichen Insektenbekämpfungsmitteln nehmen die Kontakt-Insektizide eine beherrschende Stellung ein. Sie durchdringen die Cuticula und wirken dann im Organismus toxisch. Der Mechanismus des Eindringens dieser hochtoxischen Substanzen ist immer noch ungeklärt. Das Phänomen hat aber das Interesse am Aufbau der Insekten-cuticula stark wachsen lassen. Ebenso haben die chemischen und physikalischen Veränderungen in der Cuticula im Verlaufe der Insektenentwicklung erhöhtes Interesse gefunden. Die Entwicklung der holometabolen Insekten ist durch die bekannte Folge von Larven-, Puppen- und Imaginalstadien gekennzeichnet. Bei den cyclorrhaphen Dipteren tritt als besonderes Merkmal die Bildung des Puppentönnchens auf. Dabei wird die letzte Larven-cuticula in ein tönnchenförmiges Puparium umgewandelt. Diese Pupariumbildung stellt ein interessantes Phänomen dar, das der biochemischen Analyse leichter zugänglich ist, als die eigentlichen Häutungsprozesse.

1. STRUKTURELLE ZUSAMMENSETZUNG UND HISTOLOGISCHE DIFFERENZIERUNG DER DIPTEREN-CUTICULA VOR UND NACH DER PUPARISIERUNG

Die larvale Cuticula von *Calliphora* (bzw. *Sarcophaga*) kann man histologisch in zwei Hauptschichten verschiedener Dicke differenzieren. Die äussere, dünnere Schicht wird Epicuticula genannt (1, 2, 3, 4) und besteht primär aus einer Lipoproteinschicht, zu der noch Polyphenol-, Wachs- und Zementschichten kommen können. Sie enthält kein Chitin. Die innere, dickere Schicht, die sogenannte Procuticula besteht aus Chitin und Protein; sie hat eine laminare Struktur.

Bei der Puparienbildung von *Calliphora* wird die weiche, farblose, flexible und dehnbare Cuticula der Larven in das harte und spröde Puparium umgewandelt. Zur Verhärtung tritt eine Dunkelfärbung oder Pigmentierung hinzu. Die Gesamtheit dieser Vorgänge bezeichnet man als Sklerotisierung. Vom Prozess der Sklerotisierung werden die Epicuticula und die äusseren Teile der Procuticula erfasst; die letztere wird dadurch in eine äussere (sklerotisierte) Exocuticula und in eine innere Endocuticula umgewandelt.

In Abb. 1 sind die Veränderungen der Cuticula bei Schmeissfliegen (*Sarcophaga falcata*) während der Bildung des Pupariums dargelegt. Während des Larvenwachstums wird die Cuticula dicker,

ohne die Struktur zu ändern (A $\rightarrow$ B). Bei C) wird der Zustand der Cuticula dargestellt, der kurz vor der Abtrennung des Pupariums von der Epidermis vorliegt. Die Epicuticula und die Exocuticula sind zusammengeschrumpft, verhärtet und dunkel gefärbt. Die sklerotisierte Exocuticula verändert sich nun nicht mehr, während die Endocuticula und die Epidermiszellen sich ablösen. Im Teil D) der Abbildung haben sich die Epidermiszellen abgetrennt und die Endocuticula ist durch den Wasserverlust zusammengeschrumpft.

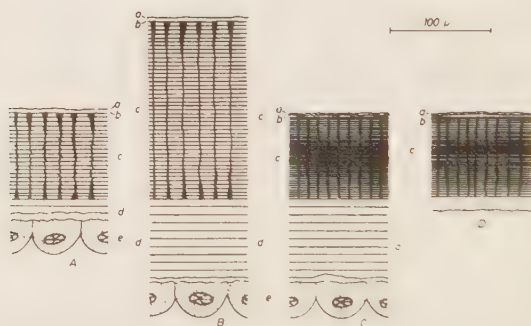


ABBILDUNG 1

Bild der Larven- und Pupariencuticula
(nach Richards, *Integument of Arthropods*, Seite 185)

- a) Äussere Epicuticula
- b) Innere Epicuticula
- c) Äussere Procuticula, bzw. spätere Exocuticula (Protein + Chitin)
- d) Innere Procuticula, bzw. spätere Endocuticula (Protein + Chitin)
- e) Epidermale Zellen

A: Junge, etwa 2 Tage alte Larven,
B: ausgewachsene Larven
C: 20 Std. altes Puparium
D: abgeworfene Puparien

2. HORMONALE REGULATION

Bei den Insekten vollzieht sich die postembryonale Entwicklung in einzelnen abgegrenzten Häutungsschritten, die hormonal gesteuert sind. Sie werden vom Gehirn eingeleitet. In bestimmten neurosekretorischen Zellen wird ein adenotropes Hormon produziert, das die Prothoraxdrüse, eine zweite hormonliefernde Drüse, zur Tätigkeit veranlasst. Das Hormon der Prothorakaldrüse leitet die Häutung ein. Der Charakter der Häutung wird bestimmt durch das Juvenilhormon, das larvale Charaktere persistieren lässt. Fehlt das Juvenilhormon, kommt es zu einer Puppen- oder Imaginalhäutung. Als erstes dieser verschiedenen Hormone, die an der Insektenentwicklung beteiligt sind, ist das Hormon der Prothorakaldrüse von Butenandt und Karlson 1954 isoliert worden (5); es führt den Namen Ecdyson. Bei der Isolierung war als biologischer Test der *Calliphora*-Test wegleitend. Er wird an abgeschnürten Larven von *Calliphora* durchgeführt (6, 7). Die isolierten Hinterstücke reagieren auf Hormoninjektion mit der Puparisierung (vgl. Abb. 3). Die Puparienbildung, die hier im Experiment durch Ecdyson ausgelöst werden kann, erscheint damit als ein besonders einfaches Modellsystem, mit dem man die Wirkung des Ecdysons näher analysieren kann. Die Veränderungen innerhalb der Cuticula, die sich äusserlich als Braunfärbung und Verhärtung zu erkennen geben, sind eine Folge von Hormonwirkung (8, 9, 10, 11, 12, 13). Sie lassen sich aber auch biochemisch näher charakterisieren.

In den folgenden Abbildungen 2 und 3 sind die Zusammenhänge zwischen dem Juvenilhormon, dem Häutungshormon Ecdyson und der Morphogenese veranschaulicht.



ABBILDUNG 2

Photographie von verschiedenen Stadien der *Calliphora*entwicklung
(Eier, Larve, Puppe, Imago)

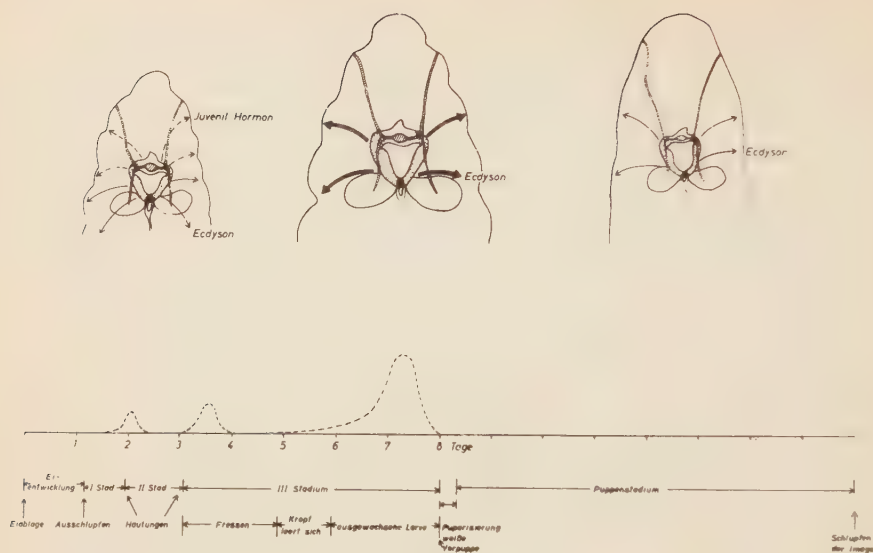


ABBILDUNG 3

Zeitlicher Verlauf der Postembryonal-Entwicklung von Calliphora mit schematischer Darstellung der Hormonausschüttung in den einzelnen Stadien (gestrichelte Kurve = Ecdysonspiegel).

Die Wirkung des Ecdysons bei der Auslösung der Gerbung konnte inzwischen teilweise geklärt werden. Das Ecdyson ist daran beteiligt, zwei wesentliche Enzyme bereitzustellen:

1. die DOPA-decarboxylase,
 2. eine Komponente des Phenoloxydase-Systems.
- (Vergleiche + in Abb. 4)

Die Dopa-decarboxylase bewirkt die Herstellung des N-Acetyldopamins. Durch die Phenoloxydase wird das N-Acetyldopamin zum entsprechenden Chinon oxidiert, das später in die Cuticula inkorporiert wird.

3. CHINONGERBUNG UNTER DER WIRKUNG DES PHENOLOXYDASE-SYSTEMS

Die Sklerotisierung der Cuticula ist vor allem von Pryor dahingehend interpretiert worden, dass Tyrosinmetaboliten in die Cuticula eingelagert werden. Bei den Tyrosinmetaboliten soll es sich um Orthochinone handeln, die aus den entsprechenden Diphenolen durch die Wirkung der Phenoloxydase hervorgehen. Man hat diesen Prozess sehr treffend verglichen mit der Chinongerbung, die bei der Lederherstellung verwendet wird. (Dort sind allerdings meist Parachinone im Spiele.) Die nähere Untersuchung des Tyrosinstoffwechsels von *Calliphora* durch Karlson und Sekeris hat zu der Erkenntnis geführt, dass Tyrosin zunächst in N-Acetyldopamin umgewandelt wird. Das N-Acetyldopamin ist die eigentliche Sklerotisierungs-Substanz.

Daraus ergibt sich für den ganzen Tyrosinstoffwechsel das in Abb. 4 dargestellte Schema.

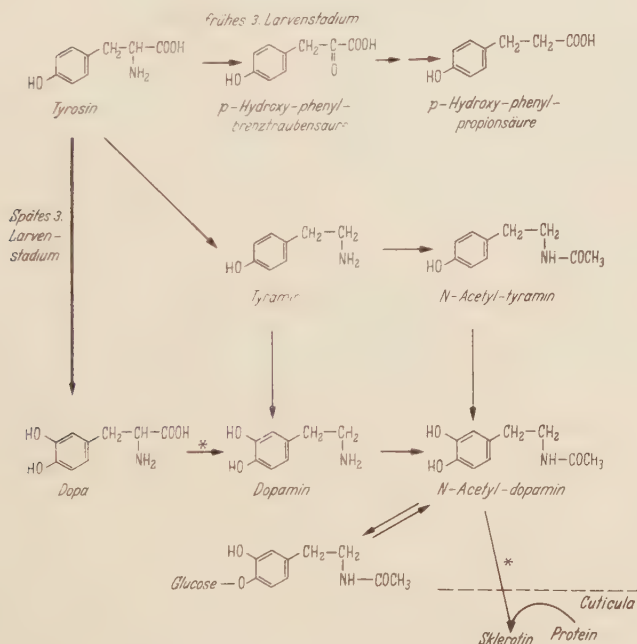


ABBILDUNG 4

Tyrosinstoffwechsel bei *Calliphora erythrocephala* während der postembryonalen Entwicklung. (+ Ecdyson kontrollierte Reaktionen)

4. ZIEL DER ARBEIT

Für die Reaktion zwischen Chinonen und Cuticula-Proteinen bei der Sklerotisierung werden von Hackman, Mason, Karlson und Denell verschiedene Bindungsmöglichkeiten vorgeschlagen. Meist wurde eine Reaktion der freien Aminogruppe des Proteins (ϵ -Lysin-gruppen und Endgruppen) mit dem o-Chinon diskutiert, entweder als Addition an das chinoide System oder als Kondensation der Carbonyl-Gruppe mit den Aminogruppen (vgl. Abb.9 und Abb.10). Diese Formulierungen sind jedoch sehr hypothetisch. Ziel der Arbeit war es deshalb, die Veränderungen der chemischen Struktur der Cuticula bei der Sklerotisierung (d.i. die Umwandlung der weichen Larvencuticula) zu studieren. Insbesondere sollten der Verbleib, die Verteilung und die Bindungsart der Tyrosinmetaboliten in der Cuticula verschiedener Stadien untersucht werden. Als Methode hierzu wurde die Markierung mit ^{14}C gewählt. Weiterhin sollte untersucht werden, welche Bindungsunterschiede zwischen den beiden Hauptkomponenten Chitin und Protein vor und nach der Verpup-pung bestehen und ob weitere, noch unbekannte Substanzen an der Sklerotisierung massgeblich beteiligt sind.

Bevor die eigenen Arbeiten geschildert werden, sollen die zu Beginn der Arbeit in der Literatur bekannten Tatsachen, die den Ausgangspunkt für die eigenen Experimente bildeten, kurz zusammengefasst werden.

B. ALLGEMEINER TEIL

I. STRUKTUR UND CHEMISMUS DER INSEKTENCUTICULA

1. Chemische Zusammensetzung und physikalische Molekularstruktur

Es ist allgemein bekannt, dass das Chitin am Aufbau der Cuticula beteiligt ist. Weniger bekannt ist, dass die Insektencuticula auch erhebliche Mengen an Protein enthält. Bei *Calliphora* sind die beiden Hauptkomponenten etwa im Verhältnis 1 : 1 vorhanden; bei anderen Insektenarten schwankt das Verhältnis von Protein und Chitin von 1 : 1 bis 20 : 1 (14). Ausser diesen Komponenten sind noch geringe Mengen Phenole, Lipide und etwas anorganische Substanzen (ca. 25 Elemente) in der Cuticula enthalten. Physikalische und chemische Untersuchungen können darüber Auskunft geben, in welcher Weise Chitin und Protein zusammengelagert sind. Hierfür ergeben sich verschiedene Möglichkeiten:

1. Komplexe Moleküle mit Haupt-Valenzbindung zwischen den Chitin- und Protein-Anteilen in der Art eines Glycoproteins;
2. durch Nebenvalenzen verbundene Chitin- und Protein-Moleküle in einer bestimmten räumlichen Ordnung;
3. Protein- und Chitin-Schichten, die übereinander liegen oder sich in irgendeiner Weise durchdringen.

Nach Richards und Mitarb. (15, 16, 17) sind in normaler Insektencuticula die Molekularketten des Proteins senkrecht zu den Chitinketten orientiert (s. Abb. 5). Die Chitinkristalliten in der Larvencuticula sind regellos angeordnet und durch Kompression oder Extension in der Lage veränderlich, während sie im braunen Puparium senkrecht zur Längsachse orientiert und in ihrer Lage fixiert sind (18, 19).

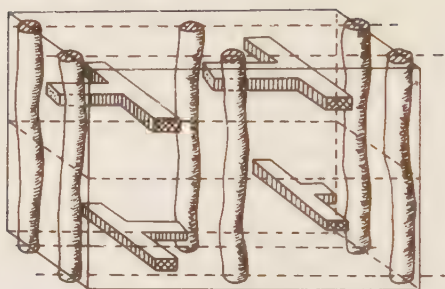


ABBILDUNG 5

Dreidimensionale Darstellung der Chitin- und Proteinmoleküle in der Cuticula (nach G. Richards und R. L. Pipa).

Die rechteckigen, waagrecht liegenden Molekülketten stellen das Chitin, die zylindrisch senkrecht stehenden das Protein dar.

2. Untersuchung der Chitinkomponente.

Das Chitin ist zusammengesetzt aus 2-Acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose-Resten, die wie Cellulose 1,4- β -glucosidisch verbunden sind (3). Das Molekulargewicht ist nicht genau bekannt. Man schätzt die Kettenlänge auf mehrere 100 bis 1000 Monosaccharid-Einheiten. In heisser Natronlauge ist Chitin unlöslich. Durch salzsaure Hydrolyse wird es zu Glucosamin abgebaut, durch Chitinase zu Acetylglucosamin (20).

Bei in vitro-Versuchen liefert das Acetyl-glucosamin mit Aminosäuren, Peptiden und Proteinen leicht spaltbare Azomethine, die sich im biologischen pH-Bereich wieder trennen (21). An Chitin können wasserlösliche Cuticulaproteine dagegen zum Teil irreversibel adsorbiert werden, und zwar besonders gut die tyrosinreichen Fraktionen (22).

3. Untersuchungen der Proteinkomponente

Das Protein der Insektencuticula ist nicht einheitlich. Bei Elektrophorese erweisen sich Proteinextrakte als heterogen (23). Die meist in weicher Cuticula vorkommenden wasserlöslichen Proteine der Procuticula bezeichnet man als Arthroprodin. Das durch Chinone gehärtete und gefärbte, wasserunlösliche Protein heisst Sklerotin. Dieses hat sich mit dem Chitin zu einem dreidimensionalen Gefüge vereinigt (siehe Abb. 5).

Hackman (14, 24, 25, 26, 27, 28, 29) hat eine Methode entwickelt, durch welche verschiedene Komponenten nacheinander herausgelöst werden. Er hält diese Extraktionsmethoden für spezifisch in Bezug auf die Bindung des Proteins an die Chitin-Schichten. Er zog zu seinen Versuchen 7 verschiedene Insektenspezies heran, die 3 Ordnungen repräsentieren (Coleoptera, Orthoptera und Hemiptera). Methode und Ergebnisse der Untersuchung der larvalen Cuticula von *Agrianome spinicollis* sind in folgender tabellarischer Übersicht zusammengefasst:

Die Aminosäurezusammensetzung der Cuticulaproteine von Insekten verschiedener Gattungen stimmt qualitativ überein. Es fällt auf, dass meist keine schwefelhaltigen Aminosäuren gefunden werden. Der quantitative Anteil der verschiedenen Aminosäuren variiert jedoch je nach Spezies und unterscheidet sich auch deutlich von allen bisher bekannten Proteinen.

TABELLE 1
Extraktionsversuche des larvalen Cuticulaproteins
von *Agrianome spinicollis*

Bindungsart an das Chitin	Extraktions- mittel	Bedingungen	Prozentgehalt
keine (wasserlöslich)	H ₂ O	30 Std/21°	14 %
van der Waals'sche Kräfte	Na ₂ SO ₄	30 Std/21°	2 %
Wasserstoffbrük- kenbindungen	7 m (NH ₂) ₂ CO	30 Std/21°	25 %
elektrovalente o. Doppelbindungen	0,01 n NaOH	30 Std/21°	3 %
covalent	1 n NaOH	15 Std/50°	56 %

Aus Tabelle 1 ist zu ersehen, dass der Hauptanteil des Proteins covalent am Chitin gebunden ist.

Denell hat die Aminosäure-Zusammensetzung der Proteine aus der Cuticula von *Calliphora*-Larven untersucht. Seine Ergebnisse decken sich mit denen von Hackmann im wesentlichen (30).

Denell ist der Meinung, dass sich Phenylalanin und Para-Tyrosin mit dem gerbenden Chinon verbinden. Auf dieses Problem wird im Zusammenhang mit den Untersuchungen zum Chemismus der Sklerotisierung noch näher eingegangen.

4. Phenolische Substanzen in der Cuticula und ihre Bedeutung für die Sklerotisierung und Melanisierung

Die Arbeiten von Pryor (31) über die Häutungsreaktion der Ootheken haben zu der heute allgemein anerkannten Vorstellung geführt, dass die Sklerotisierungsreaktion im Prinzip eine Chinongerbung darstellt. Sklerotisierungssubstanz ist in diesem Falle Protocatechusäure. Brunet und Kent haben später gezeigt, dass diese zunächst als Glucosid vorliegt und erst vor der Oxydation freigesetzt wird. Damit ergibt sich für die Ootheken folgende Reaktionsfolge (32, 33):

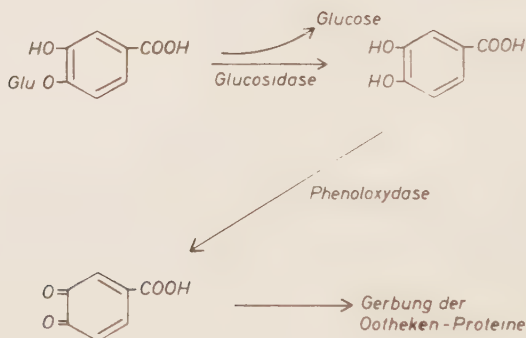


ABBILDUNG 6

Gerbung der Ootheken-Proteine

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die aus verschiedenen Insektenarten isolierten Verbindungen. Ausser der Protocatechusäure können noch andere o-Diphenole an der Sklerotisierung beteiligt sein.

TABELLE 2

Diphenole im Integument der Insekten (34-42)

	N-Acetyl- dopamin	3, 4-Dihy- droxy-Phe- nylalanin	3, 4-Dihy- droxy-Phe- nylessig- säure	3, 4-Dihy- droxy-Phe- nylmilch- säure	3, 4-Dihy- droxy- Benzoessäure
Locusta				+	
Blatta (Oetheca)					+
Cecropia (Imago)					
(Kokon)		+			
Bombyx (Larve)					+
Calliphora (Larve und Puparium)	+	+			+
Lucilia		+			
Tenebrio	+		+	+	
Sitophilus			+		
Cetonia			+		
Potosia			+		
Melolontha		+	+		
Rhizopertha			+		
Tribolium			+		+

Die häufig auftretende Aminosäure DOPA ist bekanntlich gleichzeitig Vorstufe des Melanins. Nach Räper, Mason u. a. (43, 44, 45, 46) soll die Melanisierung nach folgendem Schema verlaufen:

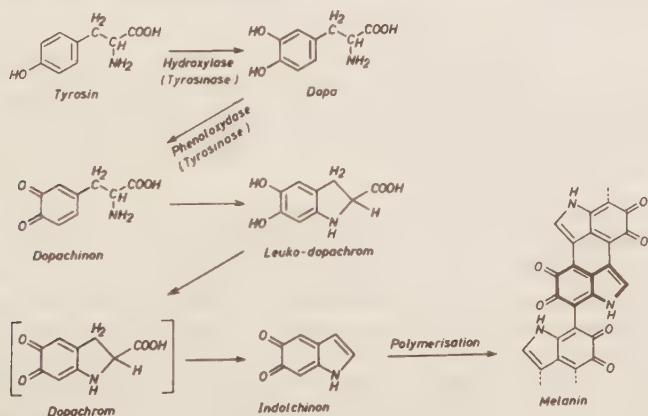


ABBILDUNG 7

Umwandlung von Tyrosin zu Melanin

(Karlson, Kurzes Lehrbuch d. Biochemie, Thieme-Verlag 1961
2. Aufl.)

Bemerkenswert daran ist, dass die Umwandlung von DOPACHINON zum Dihydro-Indolderivat kein enzymatisch katalysierter Schritt ist, sondern spontan erfolgt. Die Oxydation von DOPA oder Dopamin würde deshalb sofort in die Indolchinonreihe und weiter zu Melanin führen. Es ist aber bekannt, dass für die Melaninbildung Indolchinone, für die Sklerotisierung o-Benzochinone die Vorstufen sein dürften. Dies wurde u. a. an einer Albinomutante der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* gezeigt (59, 70, 71).

Pryor vertrat eine Zeitlang die Vorstellung, dass Kynurenin oder 3-Hydroxykynurenin an der Sklerotisierung beteiligt sein könnten (40, 41, 42). Das würde bedeuten, dass neben den o-Diphenolen auch aus Tryptophan entstandene Aminophenole eine Rolle bei der Gerbung spielen könnten. Auch diese Vorstellung hat sich nicht bestätigt. Linzen und Mitarbeiter haben gezeigt, dass Hydroxykynurenin von der Orthodiphenoloxydase nicht angegriffen wird und auch Pryor hat seine Vorstellungen inzwischen revidiert.

Im Gegensatz zu den meisten Autoren nimmt Denell an, dass nicht o-Diphenole sondern p-Diphenole an der Sklerotisierung beteiligt sind. Er hat auf Grund histochemischer Untersuchungen (30) ein ausführliches Schema aufgestellt, wonach in der Insektencuticula auch unspezifische Hydroxylierungen vorkommen können, die zu o-Tyrosin und weiterhin zu verschiedenen Paradiphenolen führen können, wobei zum Teil die Seitenkette eliminiert werden soll.

In Abb. 8 zeigt Denells Vorstellungen über die Umwandlungen der Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und DOPA und die Beziehungen zwischen ein- und mehrwertigen Phenolen in der larvalen Cuticula von *Calliphora vomitoria*.

Zur Begründung dieser Anschauung führte er Inkubationsversuche von Larvencuticula mit Phenylalanin und anderen Aminosäuren durch. Dabei trat eine Dunkelfärbung ein. In der älteren Larvencuticula, nicht aber in Puparien, entstanden Hydrochinon, Brenzcatechin und Pyrogallol (47).

Nach alkalisch-reduktiver Hydrolyse von abgeworfenen Puparien wurde von Denell eine Substanz isoliert, der er die Konstitution eines 1, 4-Diamino-3, 6-dihydroxy-Benzolderivates zuschrieb (48, 49). Dieselbe Substanz konnte bei Gerbung von Larvencuticula oder von Gelatine durch Benzochinon mit anschließender Hydrolyse erzeugt werden. Die Identität dieser Verbindung ist jedoch nicht genügend gesichert, und die Hypothese von Denell weist eine Reihe von Unklarheiten auf. Sie ist später durch die Arbeit von Karlson mit radioaktivem Hydrochinon weitgehend unwahrscheinlich geworden. Als wichtigste Vorstufen des Sklerotins wurden im allgemeinen die Carbonsäuren diskutiert. Erst Karlson und Sekeris haben gefunden, dass in der Insektenhämolymph und in der Cuticula auch N-

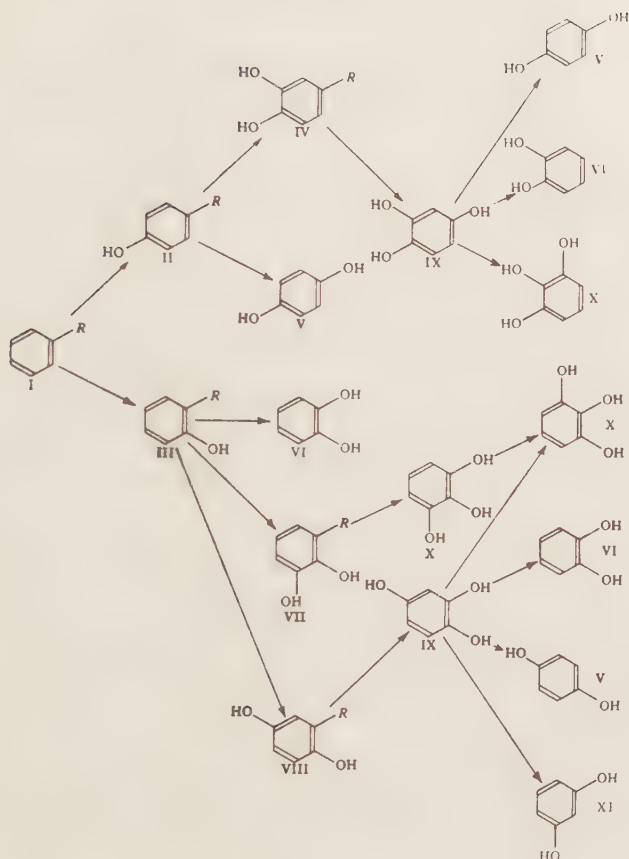


ABBILDUNG 8

Umwandlung des Phenylalanins in Diphenole nach Denell

- I. Phenylalanin,
- II. p-Tyrosin,
- III. o-Tyrosin
- IV. 3,4 Dihydroxy-Phenylalanin
- V. Hydrochinon
- VI. Brenzcatechin,

- VII. 2,3 Dihydroxy-Phenyl-
- alanin,
- VIII. 2,5 Dihydroxy-Phenyl-
- alanin,
- IX. Hydroxyhydrochinon
- X. Pyrogallol,
- XI. Resorcin.

Acetyldopamin, also eine acetylierte Base, vorkommt. Wie unten ausgeführt wird, ist diese Substanz bei *Calliphora* als die mögliche Sklerotisierungssubstanz anzusehen.

5. Modellversuche und Theorien über Bindungsmöglichkeiten zwischen Chinonen und Proteinen

Für die Reaktionen der Orthochinone ist bereits von Pryor (31) ein Formelschema aufgestellt worden. Dieses Schema hat jedoch keine Wahrscheinlichkeit für sich und braucht nicht näher diskutiert zu werden.

Es kann als gesichert angesehen werden, dass die Chinone an den Aminogruppen der Proteine angreifen. Modellversuche hierzu sind von Hackmann und Todd durchgeführt worden.

Hackmann und Todd (27) untersuchten die Reaktionen von aromatischen Aminen (z. B. Anilin), Aminosäuren und Proteinen mit Brenzcatechinderivaten in Gegenwart von oxydierenden Agenzien (Silberoxyd oder Polyphenoloxydase). Die Oxydation eines Diphenols durch Silberoxyd oder eine Phenolase liefert das entsprechende Chinon, welches in der Lage ist, mit Aminosäuren zu reagieren. Der Stickstoff der Aminogruppe wurde direkt an den aromatischen Kern addiert, und zwar zuerst in der 4- oder 5-Stellung eines ortho-Benzochinons. Daran schliesst sich möglicherweise eine Kondensation an die chinoiden Sauerstoffatome an, so dass maximal eine 4-fache Bindung des aromatischen Kernes eintreten kann. Ein Chinon mit einer Seitenkette in 4-Stellung kann nur mit 3 anderen Molekülen reagieren.

Für die Reaktion des Chinons mit Proteinen wird ein ganz analoger Mechanismus postuliert, wobei sich die endständigen Aminogruppen der Hauptkette und die der Seitenketten (z. B. die ϵ -Aminogruppe des Lysins) an das chinoide System addieren sollen.

Dieses Schema von Todd und Hackmann hat Karlson in seinen ersten Veröffentlichungen übernommen und in folgender Weise formuliert:

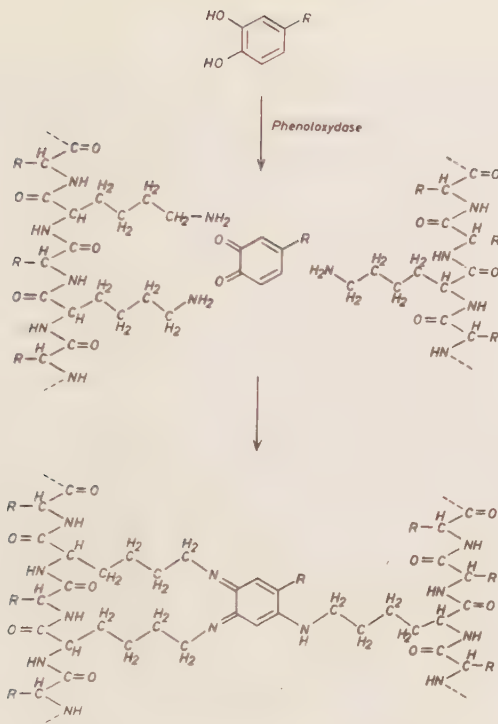


ABBILDUNG 9

Schema der Sklerotisierung bei *Calliphora erythrocephala*
nach P. Karlson

Zu einer analogen Vorstellung -allerdings ohne Ausbildung von Chinoniminstrukturen- kommt Mason auf Grund seiner Modellversuche über die Kondensation von o-Chinonen mit Proteinen unter der Wirkung von Phenolasen (50, 51, 52). Er stellte ferner fest, dass bei Protocatechusäure auch die Carboxylgruppe eliminiert und durch eine Aminogruppe ersetzt werden kann:

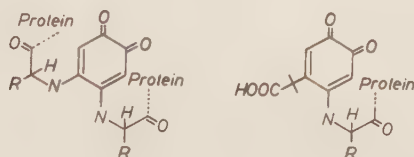


ABBILDUNG 10

Sklerotisierungsschema nach Mason

6. Spezifität der Phenoloxydasen aus Insekten

Bei seinen Versuchen zur Melaninbildung hat Raper unter anderem auch Enzymextrakte aus Insekten verwendet. Er konnte mit diesen Rohextrakten die gesamte Umwandlung vom Tyrosin bis zum dunklen Pigment durchführen (43, 44).

Die späteren Untersuchungen über die Melaninbildung wurden im wesentlichen mit pflanzlichen Enzymen durchgeführt, die sowohl Monophenole, als auch Diphenole angreifen. Karlson und Liebau gelang die Darstellung der Phenoloxydase aus *Calliphora*. Bei der Untersuchung der Substratspezifität dieses Enzyms wurde die überraschende Feststellung gemacht, dass das reine Präparat Monophenole nicht in nennenswerter Weise angreift (53, 54). Erst nach stundenlanger Inkubation ist eine Dunkelfärbung festzustellen. Von den Diphenolen werden solche mit einer sauren Seitenkette nicht angegriffen, insbesondere die früher aus Insektencuticula isolierten Phenolcarbonsäuren (3, 4-Dihydroxyphenylelessigsäure, Protocatechusäure und andere) sind keine Substrate für die Phenoloxydase aus *Calliphora*. Sehr gut angegriffen werden Dopamin und N-Acetyldopamin, wie aus dem Vergleich der Michaelis-Konstanten hervorgeht (55).

TABELLE 3

Michaelis-Konstanten (K_m) und maximale Reaktionsgeschwindigkeiten (V) verschiedener Substrate

Substrat	K_m (Mol/l)	V
Dopamin	$2 \cdot 10^{-4}$	1, 2
N-Acetyl-dopamin	$3 \cdot 10^{-3}$	3, 3
Dopa	$8 \cdot 10^{-3}$	1, 2
Noradrenalin	$1 \cdot 10^{-3}$	0, 4
Adrenalin	$1 \cdot 10^{-3}$	0, 25
Homobrenzcatechin	$8 \cdot 10^{-3}$	10
Brenzcatechin	$9 \cdot 10^{-3}$	0, 65
Adrenalin	nicht messbar	nicht messbar
Protocatechusäure	nicht messbar	nicht messbar
Kaffeensäure	nicht messbar	nicht messbar

Die Untersuchung der Substratspezifität der Phenoloxydase hat damit wesentliche Beiträge zur Frage der Sklerotisierungssubstanz leisten können. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass bei der Puparienburgung von *Calliphora* saure Verbindungen vom Typus der Protocatechusäure oder der 3, 4-Dihydroxyessigsäure in die Cuticula eingebaut werden. Die Befunde unterstützen vielmehr die Vorstellung, dass N-Acetyldopamin die eigentliche Sklerotisierungssubstanz ist.

Diese Vorstellung kann noch weiter unterbaut werden durch Studien mit radioaktiven Vorstufen, die im folgenden Absatz behandelt werden. Mit der Isotopentechnik konnte auch die Biogenese des N-Acetyldopamins weitgehend geklärt werden.

Ein entsprechendes Formelschema ist auf Seite 11 aufgeführt. Auf die Einzelheiten dieser Untersuchungen braucht hier nicht näher eingegangen zu werden, da sie zum Problem der Sklerotisierung selbst wenig beigetragen haben.

7. Einbauversuche radioaktiv markierter Vorstufen

Für das Problem der Sklerotisierung sind die Untersuchungen des Einbaues verschiedener radioaktiv markierter Chinonvorstufen in die Cuticula besonders wichtig gewesen. Radioaktiv markierte Aminosäuren wurden jeweils einen Tag vor der Pupariumbildung in die Larven injiziert und nachher die Verteilung der Radioaktivität zwischen Puppentönnchen und Puppenkörper bestimmt. Insgesamt fand man nur einen Teil der eingesetzten Aktivität wieder. Zu Beginn der Pupariumbildung tritt ein sehr rascher Anstieg der Radioaktivität im Puppentönnchen auf, der nach etwa einem Tag zum Stillstand kommt (53). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

TABELLE 4

Einbauraten radioaktiv markierter Aminosäuren
in Cuticula von *Calliphora*

Aminosäure	Markierung	Einbaurate im Puparium
L-Tyrosin	generell	74 %
DL-Tyrosin	α -C ¹⁴	34 %
DL-DOPA	α -C ¹⁴	47 %
Hydrochinon	2, 3, 5, 6-C ¹⁴	11 %
Leucin	1-C ¹⁴	4,1 %
Dopamin	α -C ¹⁴	66 %
Acetyl-Dopamin	α -C ¹⁴	63 %
Acetyl-Dopamin	Acetyl-C ¹⁴	50 %
Acetyl-Tyramin	generell	23 %

Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich beim Tyrosineinbau wohl kaum um eine Proteinsynthese handelt. Eine Beteiligung des Hydrochinons am Sklerotisierungsvorgang in dem von Denell postulierten Umfang ist ausgeschlossen.

Als sklerotisierendes o-Diphenol ist (56, 57, 58, 59) vielmehr das N-acetyl-dopamin anzusehen. Karlson und Sekeris isolierten diese Substanz aus Larven von *Calliphora erythrocephala* und identifizierten sich durch Injektionsversuche mit radioaktivem Tyrosin oder DOPA als neuen Tyrosinmetaboliten. Karlson und Ammon haben gezeigt, dass auch die Acetylgruppe des N-Acetyldopamins in die Cuticula eingebaut wird. Es darf somit als sicher gelten, dass das N-Acetyldopamin ohne wesentlichen Abbau zur Sklerotisierung verwendet wird.

Die geschilderten Untersuchungen verschiedener Autoren führen primär zu der Erkenntnis, dass phenolische, bzw. chinoide Substanzen für die Gerbung der Cuticula verantwortlich sind. Über den Ablauf der Sklerotisierung bestanden noch recht widerspruchsvolle und nur wenig gesicherte Vorstellungen. Man wusste nicht, welche von den isolierten Metaboliten des Tyrosins im direkten Zusammenhang mit der Häutung und Färbung der Cuticula stehen.

II. EIGENE ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN ZUR STRUKTUR UND ZUM CHEMISMUS DER SKLEROTISIERTEN CUTICULA VON *CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA*

1. Quantitativer und quantitativer Aufbau der *Calliphora*-cuticula als Ausgangspunkt eigener Untersuchungen

Die Chemie der Sklerotisierung der Insektencuticula war als Beispiel einer Hormonwirkung von Interesse, denn im *Calliphora*-Test wird gerade die Sklerotisierung als biochemisch/biologische Testreaktion auf das Metamorphosehormon Ecdyson verwendet. Für die Biochemie dieser Reaktion lagen bereits Voruntersuchungen englischer Autoren vor, die im vorhergehenden Abschnitt ausführlich dargestellt wurden. Sie haben zu der Vermutung geführt, dass Chinone massgeblich an der Sklerotisierungsreaktion beteiligt sind, die eigentliche Reaktion der Chinone mit den Proteinen der Cuticula jedoch nicht klären können. An diesem Punkt sollten die eigenen Versuche ansetzen.

Von Karlson war die Methode der radioaktiven Markierung auf dem Sklerotisierungsproblem angewendet worden. Diese Methode wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. Es sollte versucht werden, durch Einbau radioaktiver Vorstufen -etwa Tyrosin oder N-Acetyldopamin- in die Cuticula ein Sklerotin zu erzeugen, das radioaktive Bausteine enthielt. Durch Abbauversuche konnte

man hoffen, den Ort der Reaktion zwischen der Sklerotin-Vorstufe und den Cuticulasubstanzen (in erster Linie war dabei an das Cuticulaprotein gedacht) festzulegen. Voraussetzung hierfür war die Kenntnis der vor und nach der Verpuppung vorliegenden Substanzen. Durch chemischen Abbau sollten die Komponenten, vor allem die Proteine, in die einzelnen Bestandteile zerlegt und das Gemisch analysiert werden.

Diese Versuche sind im folgenden beschrieben. Sie haben zu dem Ergebnis geführt, dass manche der oben angeführten Hypothesen nicht richtig sein können, andere wahrscheinlich aber den tatsächlichen Verhältnissen nahekommen.

2. Untersuchungen des Cuticula-Proteins

Zunächst sollten durch Hydrolyse die Bausteine der Cuticula-Proteine, d.h. die Aminosäuren, freigesetzt und qualitativ sowie quantitativ bestimmt werden. Die Hydrolyse wird kompliziert durch das reichlich vorhandene Chitin; es ist schon lange bekannt, dass Kohlenhydrate die Hydrolyse stören, weil ihre Zersetzungsprodukte mit den Aminosäuren reagieren. Überdies ist die sklerotisierte Cuticula gegen chemische Eingriffe recht widerstandsfähig.

Um die günstigsten Bedingungen zur Trennung der einzelnen Komponenten des Cuticula-Materials zu ermitteln, wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt. Es wurden Hydrolyse-, Dialyse- und Extraktionsversuche mit verschiedenen Temperaturen und Zeiten (zum Teil unter Ausschluss von Luftsauerstoff) ausgeführt.

In Tabelle 5 sind Werte zusammengefasst, die sich aus Hydrolyseversuchen abgeworfener Puparien mit verschiedenen Säuren und anschliessender Dialyse ergaben.

TABELLE 5

Hydrolyseversuche an abgeworfenen Puparien

	30 % H_2SO_4	2 n HCl	6 n HCl	konz. HCl
nicht hydrolysiert (ungelöster Rückstand)	-	39,4 %	3,8 %	7,0 %
hydrolysiert (in Lösung gegangen)	100,0 %	60,6 %	96,2 %	93,0 %
nicht dialysierbar	6,6 %	23,6 %	5,5 %	30,0 %
dialysierbar	93,4 %	76,4 %	94,5 %	70,0 %

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass die Hydrolyse mit 6 n Salzsäure am günstigsten ist. Der grösste Teil der hydrolysierten Sub-

stanz ist dialysabel und hat vermutlich ein Molekulargewicht, das nicht höher als 600 ist.

Temperaturen über 100°C führen zu stärkerer Zersetzung, während man unter 90°C eine unvollkommene Hydrolyse der Proteine und des Chitins erhält.

Entsprechend diesen Erfahrungen wurden abgeworfene Puparien in 6 n Salzsäure 20 Stunden bei 98°C hydrolysiert. Die zweidimensionale Papierchromatographie ergab folgende qualitative Aminosäurezusammensetzung:

Lysin	Histidin	Arginin
Asparaginsäure	Threonin	Serin
Glutaminsäure	Prolin	Hydroxyprolin
Glycin	Alanin	Valin
Isoleucin	Leucin	Tyrosin
Phenylalanin	Dopa	

Es fehlen: Cystein, Cystin und Methionin

Wegen der grossen Menge an Kohlenhydraten entstehen bei der Hydrolyse stets Huminstoffe. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, wurde eine vorherige Trennung von Chitin und Protein angestrebt. Sie gelang durch 60-stündige Extraktion mit 1 n-Natronlauge. Nach Hydrolyse des extrahierten Proteins liessen sich auch hier die oben angegebenen Aminosäuren identifizieren. Bei der Extraktion verschwand die braun-schwarze Färbung der Puparien und es blieb nur das fast farblose Chitingerüst zurück. Ferner konnte eine Freisetzung von Ammoniak und von Aminen festgestellt werden.

Im Aminosäure-analysator untersuchte Hydrolysate von Calliphorapuparien ergaben die in folgender Tabelle zusammengefassten Werte:

TABELLE 6

Gehalt an Aminosäuren und Glucosamin in Calliphorapuparien

	Mol-% mit Glucosamin	Mol-% ohne Glucosamin
Lysin	2,6	3,9
Histidin	4,0	5,9
Arginin	3,8	4,0
Glucosamin	31,3	
Asparaginsäure	7,9	11,5
Threonin	3,6	5,2
Serin	5,5	8,0
Glutaminsäure	10,9	15,8
Prolin	4,8	7,0
Glycin	5,5	8,0
Alanin	4,3	6,2
Valin	4,8	7,0
Isoleucin	2,6	3,8
Leucin	3,2	4,7
Tyrosin	3,3	4,8
Phenylalanin	2,9	4,2
	100,0	100,0

3. Untersuchung des Chitins

Bei den qualitativen Untersuchungen auf Kohlenhydrate in den Calliphora-Puparien konnten Glucosamin und eine nicht näher identifizierte Aldopentose festgestellt werden.

Wie schon oben erwähnt, gelang eine quantitative Trennung des Chitins und des Proteins durch alkalische Extraktion. Die Puparien wurden dabei entfärbt, behielten aber ihre ursprüngliche Form.

Im Aminosäureanalysator wurde als einziges Spaltprodukt Glucosamin gefunden, andere ninhydrinpositive Substanzen traten nicht auf.

4. Änderung der chemischen Zusammensetzung der Calliphora-Cuticula durch die Puparisierung

- a) Die Untersuchung des Wassergehalts der Cuticula vor und nach der Puparisierung ergab folgende Durchschnittswerte:

	Frischgewicht	Trockengewicht
Kurz vor der Puparisierung	9 mg	2,9 mg
abgeworfene Puparien	4,1 mg	3,8 mg

Daraus errechnen sich folgende Wassergehalte:

Larvencuticula:	67,8 %
Puparien:	7,3 %

Der Wassergehalt der Cuticula sinkt also bei der Umwandlung der Larvencuticula zum Puparium, während zur gleichen Zeit das Trockengewicht um 31 % zunimmt.

- b) Da die Löslichkeitsverhältnisse der Cuticulabestandteile und speziell des Proteins interessierten, wurden Larvencuticeln und Puparien verschiedener Stadien mit Wasser (48 Stunden bei 50°C) extrahiert. Es ergab sich folgende Gewichtsverteilung:

TABELLE 7
Löslichkeitsverhältnisse der Cuticula von Calliphora

	Larven- Cuticula	weisse Vor- puppen	2 Tage alte Puppen	abge- werfene Puparien
H ₂ O-Extrakt	45,7 %	35,4 %	14,7 %	12,6 %
1-n-NaOH-Extrakt	14,1 %	26,3 %	55,2 %	57,5 %
Chitinrückstand	40,3 %	38,3 %	30,1 %	29,9 %
	100,1 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %

Aus Tabelle 7 ist ersichtlich, dass während der Entwicklung der farblosen, larvalen Cuticula zur braunen, gehärteten Cuticula der Puparien die Wasserlöslichkeit der Proteine abnimmt.

Die Änderung der Löslichkeit erfolgt innerhalb kurzer Zeit: vom Beginn der Kontraktion bis etwa einen Tag nach Beginn der Braunfärbung. Die braun-schwarze Pigmentierung muss mit diesem Wechsel direkt zusammenhängen. Die Natronlauge-Extrakte sind durchweg dunkelbraun gefärbt, während die Wasserextrakte hellgelb sind.

- c) Untersuchung des Stickstoffgehalts (nach Dumas) von präparierten Larvencuticeln und abgeworfenen Puparien sollten im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Untersuchung der Löslichkeitsverhältnisse helfen, die Verteilung des Stickstoffs bzw. der stickstoffhaltigen Substanzen aufzuklären.

Aus den erhaltenen Werten:

Larvencuticula:	10,84 % N
Puparium:	10,23 % N

ergibt sich, dass die Änderung des Stickstoff-Gehalts nicht wesentlich ist.

d) Weitere Bestandteile

Die in Tab. 7 aufgeführten Rückstände können als praktisch reines Chitin angesehen werden. Nimmt man für Chitin einen N-Gehalt von 6,9 % an und für das Protein einen Durchschnitts-Stickstoffgehalt von 16 %, so kann man aus dem Gesamt N-Gehalt den Proteinanteil errechnen:

	Chitin	Protein	Stickstofffreie Anteile
Larvencuticula	40,3 %	51,0 %	8,5 %
Puparium	29,9 %	51,1 %	19,1 %

Dabei ist Voraussetzung, dass ausser Chitin und Protein keine andere stickstoffhaltige Substanz vorliegt. Die so berechneten Proteinwerte sind zu hoch, weil sich noch weitere stickstoffhaltige Substanzen wie z. B. Dopamin in der Cuticula befinden. Aus der quantitativen Aminosäure-Analyse des Hydrolysats von Puparien konnte folgende Zusammensetzung berechnet werden:

	Chitin	Protein	sonstige N-freie und N-haltige Substanzen
Larvencuticula	40,3 %	45,1 %	14,6 %
Puparium	29,8 %	45,5 %	24,7 %

Bei etwa 25 % der Bestandteile des Pupariums handelt es sich also um Substanzen, die weder protein- noch chitinartig sind, sie spielen, wie später gezeigt wird, eine wesentliche Rolle bei der Sklerotisierung.

In Abb. 11 und 12 sind diese Ergebnisse dargestellt. Sie lassen erkennen, dass während der Puparisierung die Löslichkeit abnimmt.

Berücksichtigt man die 31 %ige Zunahme des Trockengewichtes, dann bleibt der Chitingehalt unverändert während der Anteil der Proteinfraction und der nicht chitin- bzw. proteinartigen Substanzen steigt.

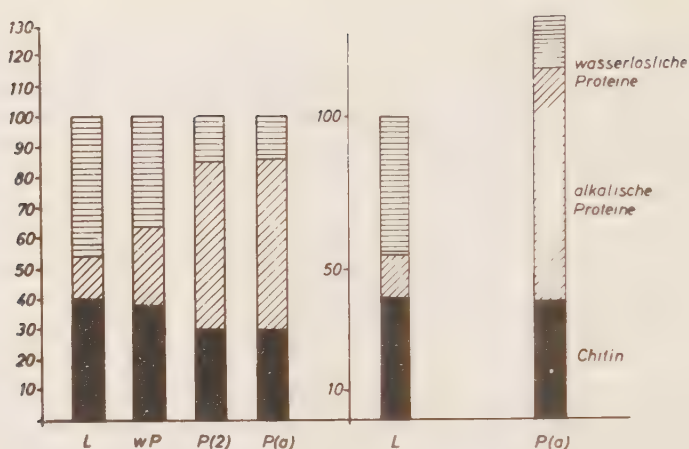


ABBILDUNG 11

Löslichkeitsverhältnisse verschiedener Cuticulastadien ohne (links) und unter Berücksichtigung der Zunahme des Trockengewichtes.

L = Larvencuticula

P(2) = 2 Tage alte Puparien

WP = Cuticula weisser Vorpuppen

P(a) = abgeworfene Puparien

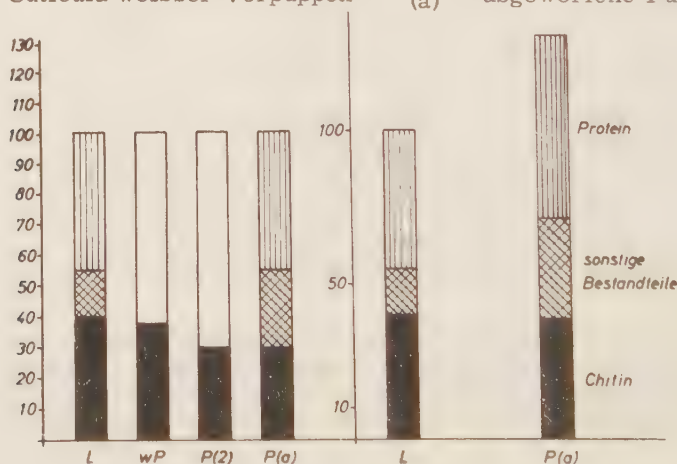


ABBILDUNG 12

Substanzverteilung verschiedener Cuticulastadien ohne (links) und unter Berücksichtigung der Zunahme des Trockengewichtes.

5. Quantitative Verteilung von radioaktivem Tyrosin nach der Puparisierung

Die vorstehend geschilderten Untersuchungen zum chemischen Aufbau der *Calliphora*-Cuticula führten zu der Frage, ob nicht weitere stickstofffreie Substanzen in Verbindung mit den bereits festgestellten Tyrosinmetaboliten bei der Sklerotisierung eine Rolle spielen. Dieses Problem wurde unter Verwendung radioaktiven Tyrosins in Angriff genommen: Es sollten der Verbleib, die Verteilung und die Bindungsarten der Tyrosinmetaboliten in der Cuticula studiert werden.

Hierzu wurde *Calliphora*-Larven generell markiertes Tyrosin injiziert. Um die Verteilung der Aktivität des injizierten Tyrosins zwischen Puparien und Inhalt zu untersuchen, wurden *Calliphora*puppen in verschiedenen Zeitabständen nach der Kontraktion aussortiert, präpariert und der nassen Verbrennung nach van Slyke-Folch mit Chromschwefelsäure unterworfen. Die nach dieser Analyse berechneten und korrigierten Werte sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

TABELLE 8
Einbau und Verteilung von Tyrosin in *Calliphora*

Zeit nach Kontraktion	Spezifische Aktivitäten		$\frac{a}{b}$	Gesamtaktivität	
	a) Puparien	b) Inneres c/min/mg		Puparien	Inneres
2 Std.	500	904	0,55	27,0 %	73,0 %
5 Std.	506	292	1,73	53,5 %	46,5 %
12 Std.	1786	262	6,82	77,9 %	22,1 %
1 Tag	1606	179	8,97	82,9 %	17,1 %
2 Tage	2123	249	8,53	83,2 %	16,8 %
3 Tage	1740	166	10,48	84,0 %	16,0 %
4 Tage	2530	140	18,07	88,9 %	11,1 %
5 Tage	2280	163	13,99	88,1 %	11,9 %
6 Tage	1750	188	9,31	85,3 %	14,7 %
7 Tage	1835	108	16,99	88,7 %	11,3 %
8 Tage	1650	189	8,73	84,4 %	15,6 %
10 Tage	2090	186	11,24	85,1 %	14,9 %
abgeworfene	2210	109	20,28	90,2 %	9,8 %

Es zeigt sich, dass ein Einbau von Tyrosin hauptsächlich während der ersten 24 Stunden nach Beginn der Verpuppung stattfindet. Für den im Puparium wiedergefundenen Anteil ergibt sich ein Durchschnittswert von etwa 85 % der Gesamtaktivität. Dieser liegt bedeutend höher als der für den Einbau von Dopamin mit 65 %. Selbst wenn man das Fehlen des Carboxyl-Kohlenstoffs beim Dopamin berücksichtigt, bleibt eine Differenz von etwa 10 %.

Radioaktive, abgeworfene Puparien wurden mit Salzsäure hydrolysiert und ein Teil des wasserlöslichen Hydrolysates dialysiert.

TABELLE 9
Gewichts- und Radioaktivitätsverteilung
nach Hydrolyse und Dialyse
von radioaktiven, abgeworfenen Puparien

	Gewichtsanteile an Substanz %	Imp/ min/ mg	Aktivitätsanteil %
ungelöster Rückstand	3,3	715	23,4
lösliche Anteile	96,7	80	76,6
Dialysat-Rückstand (+)	6,7 (+)	203	19,3
Dialysat	93,3 (+)	61	80,7

(+) bezogen auf lösliche Anteile

Aus den in Tab. 9 wiedergegebenen Ergebnissen geht hervor, dass sich im Hydrolyse- und Dialyserückstand zwar die höheren spezifischen Aktivitäten befinden, der grösste Teil der Gesamtaktivität sich jedoch im löslichen und dialysierbaren Anteil nachweisen lässt. Melanine blieben im Hydrolyserückstand zurück.

6. Untersuchung auf radioaktive phenolische Substanzen

Bisher wurde festgestellt, dass der Hauptanteil des radioaktiven Tyrosins in die sklerotisierte Cuticula eingebaut wird und dass das radioaktive Material nach Extraktion, Hydrolyse und Dialyse fast vollständig in Lösung geht. Es können also nur geringe Mengen an Melanin vorhanden sein, da dieses unter den erwähnten Bedingungen unlöslich bleibt.

Es sollte nun versucht werden, aus Extrakten oder Hydrolysaten die radioaktiven phenolischen Substanzen zu isolieren, die von einigen Autoren für die Gerbung verantwortlich gemacht werden.

Zu diesem Zweck wurden 12 Stunden, 1 Tag und 2 Tage alte, abgeworfene, radioaktive Puparien 20 Stunden mit 6 n-Salzsäure bei 98°C hydrolysiert und papierchromatographisch untersucht. Zum Teil wurde erst nach vorheriger Extraktion mit 1 n-NaOH (zwecks Abtrennung vom Chitin) hydrolysiert. Folgende Phenole wurden identifiziert:

Protocatechusäure
Kynurenin
Tyrosin

Pyrogallol
3-Hydroxykynurenin
Dopa

Bei Anwendung verschiedener Chromatographiesysteme blieb die gesamte Radioaktivität stets am Startpunkt. Es konnten keinerlei radioaktive Phenole oder Phenolcarbonsäuren identifiziert werden. Auch das Tyrosin der Cuticulaproteine war völlig inaktiv. Dieser unerwartete Befund beweist, dass das Tyrosin vor dem Einbau in die Cuticula zum grössten Teil verändert worden ist. Radioaktives Tyrosin ist nur in weissen Vorpuppencuticeln eines bestimmten Alters nachzuweisen. Dopamin findet man in wässrigen und alkalischen Cuticula-Extrakten von weissen Vorpuppen erst nach Hydrolyse (siehe Teil 7) . Aus brauner Pupariencuticula konnte kein radioaktives Tyrosin oder Dopamin isoliert werden.

Wie schon oben festgestellt wurde, blieb bei den papierchromatographischen Untersuchungen der Hydrolysate eine braune Substanz im Startpunkt hängen. Da diese die gesamte Radioaktivität enthielt, wurde versucht, ihre Zusammensetzung festzustellen. Zu diesem Zwecke wurden folgende Versuche durchgeführt:

Ein Tag alte Puparien und abgeworfene Puparien wurden mit Salzsäure hydrolysiert und zur völligen Entfernung von Aminosäuren, Glucosamin, Phenole und sonstiger Substanzen mehrmals papierchromatographiert.

Die Mikroanalyse der aus dem Startpunkt extrahierten Fraktion ergab folgende Werte:

C = 42,23 %	H = 6,12 %
N = 8,93 %	O = 42,73 % (Diff.)

Die im UV gemessenen Absorptions-Spektren von sauren und alkalischen Lösungen ergaben Maxima bei 280 bzw. 285 m μ .

Der berechnete, hohe Sauerstoffgehalt der nicht protein- und nicht chitinartigen Komponenten, die im Zusammenhang mit den radioaktiven Abbauprodukten der sklerotisierten Cuticula auftreten, liess ein Kondensationsprodukt zwischen einem Kohlenhydrat und einem Metaboliten des Tyrosins vermuten. Jedoch fielen die Nachweisreaktionen auf Kohlenhydrate (Molisch, Osazon, Fehling, Anilinhthalat, etc.) sämtlich negativ aus. (Auch in alkalischen Extrakten von Larvencuticeln, weissen Vorpuppen und abgeworfenen braunen Puparien konnten keine Kohlenhydrate nachgewiesen werden.)

In einer später zu beschreibenden Versuchsreihe (siehe Abb.17) wurde das oben isolierte Produkt hydroxyliert, und man erhielt 2 radioaktive Umbauprodukte.

7 Untersuchung weisser Vorpuppen von *Calliphora*

Die weissen Vorpuppen stellen ein kurzes Übergangsstadium zwischen Larve und Puparium dar. Es beginnt mit der Kontraktion der Larven und dauert etwa 3 Stunden; dann wird die Braunfärbung sichtbar. Dieses Stadium versprach interessante Aufschlüsse über die Primärvorgänge der Sklerotisierung. Es wurde deshalb erwachsenen Larven (Maden) radioaktives Tyrosin bzw. Dopamin injiziert und die Cuticula nach der Kontraktion, aber noch vor der Braunfärbung präpariert.

Zunächst wurde die Cuticula der weissen Vorpuppen mit Wasser extrahiert. Der Rückstand wurde dann mit 1 n Natronlauge, bei der Tyrosinserie zum Teil auch mit 1 n Salzsäure weiterextrahiert.

Substanzverteilung bei Tyrosininjektion:

1. H ₂ O-Extrakt:	35,4 %	
2. NaOH-Extrakt:	26,3 %	zus. 61,7 %
3. Rückstand:	38,3 %	

Substanzverteilung bei Dopamininjektion:

1. H ₂ O-Extrakt:	36,5 %	
2. NaOH-Extrakt:	25,8 %	zus. 62,3 %
3. Rückstand:	37,7 %	

Durch Natronlauge- oder Salzsäure-Extraktion wurden aus dem H₂O-unlöslichen Material fast gleiche Anteile herausgelöst, nämlich 41,2 bzw. 40 %.

Die Menge der wasser- und alkalilöslichen Anteile liegt zwischen den Werten, die für die entsprechenden Extrakte bei Larven und abgeworfenen Puparien gefunden wurde (siehe Seite 28). Man kann wohl annehmen, dass in dem Übergangszustand der weissen Vorpuppen die Bindungsverhältnisse innerhalb der Proteinmoleküle (und damit ihre Löslichkeit) oder die Bindungen zwischen Protein und Chitin verändert werden.

Die Untersuchungsergebnisse der einzelnen Fraktionen sind in der Tabelle 10 zusammengefasst.

TABELLE 10

Untersuchungsergebnisse der mit
Tyrosin bzw. Dopamin injizierten weissen Vorpuppen

Bearbeitung	Verbleib der Radioaktivität bei Papierchromatographie	Identifizierte Substanzen
<u>Radioaktive Substanz: Tyrosin</u>		
1) H ₂ O-Extraktion	Start.	-
1) H ₂ O-Extraktion	Start; 0, 34; 0, 46	Dopamin
2) Hydrolyse		Tyrosin
1) H ₂ O-Extraktion	Start; 0, 34; 0, 46	Dopamin
2) NaOH-Extraktion		Tyrosin
3) Hydrolyse		
1) H ₂ O-Extraktion	Start; 0, 34; 0, 46	Dopamin
2) HCl-Extraktion		Tyrosin
3) Hydrolyse		
<u>Radioaktive Substanz: Dopamin</u>		
1) H ₂ O-Extraktion	Start.	-
1) H ₂ O-Extraktion	Start; 0, 34;	Dopamin
2) Hydrolyse		
1) H ₂ O-Extraktion	Start; 0, 34;	Dopamin
2) NaOH-Extraktion		
3) Hydrolyse		

(Siehe auch Abb.17)

Die beiden aus den Cuticula von weissen Vorpuppen isolierten Verbindungen Dopamin und Tyrosin müssen an Protein gebunden sein, weil sie vor der Hydrolyse nicht als freie Verbindungen nachgewiesen werden können. Beide Verbindungen können zuzüglich auch als N-Acetate vorliegen; die Acetylgruppen würden unter den gegebenen hydrolytischen Bedingungen abgespalten.

Die Radioaktivität verteilt sich bei allen Aufarbeitungen zwischen Start, Dopamin und Tyrosin etwa im Verhältnis 5 : 3 : 2. Die im Startpunkt zurückbleibenden radioaktiven Substanzen sind nach den vorliegenden Erfahrungen als Abbauprodukte des Dopamins anzusehen.

8) Reduktive alkalische Hydrolyse

Das alkalische Hydrolysat (6 n NaOH und SnCl_2) abgeworfener Puparien wurde angesäuert und nacheinander mit Äther, Amylalkohol und Butanol extrahiert. Die Ergebnisse der papierchromatographischen Untersuchung, die in Tabelle 11 zusammengefasst sind, deuten darauf hin, dass nach der reduktiven alkalischen Hydrolyse mindestens 4 verschiedene radioaktive Substanzen entstehen, bei denen es sich offenbar vornehmlich um aromatische Dihydroxyverbindungen handelt.

Bei einem anderen Versuch wurde das Produkt der reduktiven alkalischen Hydrolyse in Alkohol aufgenommen und mit 2 n Natronlauge bei pH_1 , pH_5 und pH_9 fraktioniert ausgefällt. Alle 3 Fraktionen wurden mit Natriumhydrogencarbonat extrahiert. Der Rückstand blieb weiss, der Extrakt war braun und enthielt die Radioaktivität in 72-facher Anreicherung gegenüber dem Rückstand. Die so isolierten, äusserst empfindlichen Substanzen zeigten nach 2-facher Rechromatographie im IR-Spektrum nur Carboxyl- und Hydroxylbanden. Auf Grund dieser Ergebnisse kann man dem von R. Denell vorgeschlagenen Sklerotisierungsablauf nicht zustimmen. Das von ihm angeführte Aminophenol wurde nicht gefunden.

TABELLE 11a

Ergebnisse der reduktiv alkalischen Hydrolyse
von abgeworfenen Calliphora-Puparien

Extraktions- mittel:	Äther			
R. F. - Wert	0,95	0,89	0,87	0,81
Farbe im sichtb. Licht	grauviolett	rotviolett	-	-
Fluoreszenz im UV	-	-	rotviolett	blau
Radioaktivität	+	++	++	+
Papierelektro- phorese	+ Pol			

Extraktions- mittel:	Amylalkohol			
R. F. - Wert	0,91			0,80
Farbe im sichtb. Licht	braun			braun
Fluoreszenz im UV	braun			grünbraun
Radioaktivität	++			++
Papierelektro- phorese				

Extraktions- mittel:	Butanol			
R. F. - Wert	0,93		0,86	
Farbe im sichtb. Licht	braun		-	
Fluoreszenz im UV	-		hellblau	
Radioaktivität	+			
Papierelektro- phorese	- Pol			
=====				

TABELLE 11b

Ergebnisse der reduktiv alkalischen Hydrolyse
von abgeworfenen Calliphora-Puparien

Extraktions- mittel:	Äther			
R. F. - Wert	0,95	0,89	0,87	0,81
Diazo-Sulf. S.	rotbraun	orange	orange	rotbraun
FeCl ₃	grau	braun	dunkelviolett	grün
Folin	blau	blau	blau	blau
Ferricyanid	rotbraun	rotbraun	rotbraun	rotbraun
Ninhydrin	-	-	-	-
Extraktions- mittel:	Amylalkohol			
R. F. - Wert	0,91			0,80
Diazo-Sulf. S.				
FeCl ₃	-	-		
Folin				
Ferricyanid				
Ninhydrin	-	(+)		
Extraktions- mittel:	Butanol			
R. F. - Wert	0,93		0,86	
Diazo-Sulf. S.				
FeCl ₃	-	-		
Folin	blau	blau		
Ferricyanid	-	rot		
Ninhydrin	(+)	(+)		

9. Fraktionierungsversuche der Hydrolysate brauner Puparien

Folgende Fraktionierungsversuche wurden unternommen, um die radioaktiven Substanzen anzureichern.

- a) Um die Aktivitäts- und Substanzverteilung zwischen Butanol und Wasser zu untersuchen, wurde das Hydrolysat in einem Gemisch von Butanol-H₂O (1 : 1) geschüttelt.

Gewichtsverteilung:

$\text{H}_2\text{O} : \text{Butanol} = 84,0 \% : 16 \%$

Gesamtaktivitätsverteilung:

$\text{H}_2\text{O} : \text{Butanol} = 83,6 \% : 16,4 \%$

Spezifische Aktivität:

In $\text{H}_2\text{O} : 382 \text{ Imp/min/mg}$ in Butanol : 397 Imp/min/mg

Die Gewichts- und die Gesamtradioaktivitätsverteilung entsprechen einander. Ebenso sind die spezifischen Radioaktivitäten in beiden Phasen gleich.

- b) Weiterhin wurden säulenchromatographische Versuchsreihen an Perlonpulvern durchgeführt, um eine Auftrennung der einzelnen Komponenten der Hydrolysate und eine Anreicherung von radioaktivem Material zu erreichen.

Die Säulen wurden mit Wasser, Wasser-Methanol-Gemischen und Essigsäure verschiedener Konzentration eluiert. Man erhielt 2 Hauptfraktionen. Tabelle 12 gibt die Verteilung der Gesamtsubstanz und der Gesamtaktivität in den beiden Hauptfraktionen wieder:

TABELLE 12
Säulenchromatographische Auftrennung
von abgeworfenen Puparien von Calliphora

	Substanz	Gesamtaktivität
I. Hauptfraktion (mit H_2O -Methanol 1 : 1 eluiert)	81,3 %	88,8 %
II. Hauptfraktion (mit 50 % Essigsäure eluiert)	18,7 %	11,2 %

In der I. Hauptfraktion wurden 16 Aminosäuren, Glucosamin, eine Aldopentose und die schon erwähnten Phenole identifiziert, während in der II. Hauptfraktion nur wenige sehr schwach ninhydrinpositive Substanzen festzustellen waren. Auch durch Einzelfraktionierung der Hauptfraktionen konnte eine Anreicherung oder Abtrennung der radioaktiven Substanz von den Aminosäuren und dem Glucosamin nicht erreicht werden.

10. Extraktionsversuche an Puparien Radioaktivitätsverteilung und Änderung der Zusammensetzung

Da die Fraktionierungsversuche an Hydrolysaten von Puparien zu keiner brauchbaren Trennung führten, wurde versucht, eine Anreicherung durch fraktionierte Extraktion der Puparien zu erreichen. Durch Wahl der Extraktionsmittel konnte man Auskunft über die Bindungsverhältnisse zwischen Protein, Chitin und der stickstofffreien Substanz sowie über die Radioaktivitätsverteilung erwarten. Folgende Extraktionen wurden durchgeführt:

Wasserlösliche Proteine wurden mit Wasser bei Zimmertemperatur entfernt. Bindungen in Art van der Waal'scher Kräfte wurden mit 0,167 M Natriumsulfatlösung, die Wasserstoff-Brückenbindungen mit 7 M wässriger Harnstofflösung getrennt. Kovalente Bindungen wurden mit 1 n Natronlauge gesprengt. Hierbei wurde mehrfach mit Natronlauge extrahiert, bis lediglich das fast weisse Chitin zurückblieb.

Die Gewichtsanteile, die spezifischen sowie die Gesamtradioaktivitäten der extrahierten Fraktionen sind in Tabelle 13 zusammengestellt.

TABELLE 13

Gewichts- und Radioaktivitätsverteilung
bei fraktionierter Extraktion abgeworfener Puparien von Calliphora

Extraktionsmittel	Gesamtgew. %	Spez. Akt. Imp/min/mg	Gesamtakt. Imp	Gesamtakt. %
a) H ₂ O	9,5	113	7910 =	2,4
b) Na ₂ SO ₄ + (NH ₂) ₂ CO	2,9	42	924 =	0,3
c) 1 n NaOH	K₁ K₂ K₃ K₄ K₅	231	56133 =	16,9
		1901	260437 =	78,4
		193	5211 =	1,6
		51	816 =	0,2
d) Chitin- rückstand	29,9	4	880 =	0,3

Der gesamte extrahierte Anteil beträgt 70,1 %. Die alkalischen Extrakte c) K₁ - c) K₅ enthalten 57,5 % des Gesamtgewichts.

Die Radioaktivitätsmessungen wurden mit dialysierten Proteinen durchgeführt. Sie zeigen, dass in den alkalischen Extrakten und

insbesondere in der Fraktion c) K_3 der grösste Teil der gesamten Radioaktivität zu finden ist. Sie weist auch die höchste spezifische Aktivität und die intensivste Dunkelbraunfärbung auf.

Die wasserlöslichen Fraktionen a) und b) haben geringe Aktivität, und der Chitinrückstand ist fast von jeder Aktivität befreit. Somit entfallen 97,1 % der Gesamtradioaktivität auf die alkalische Gesamtfraction c).

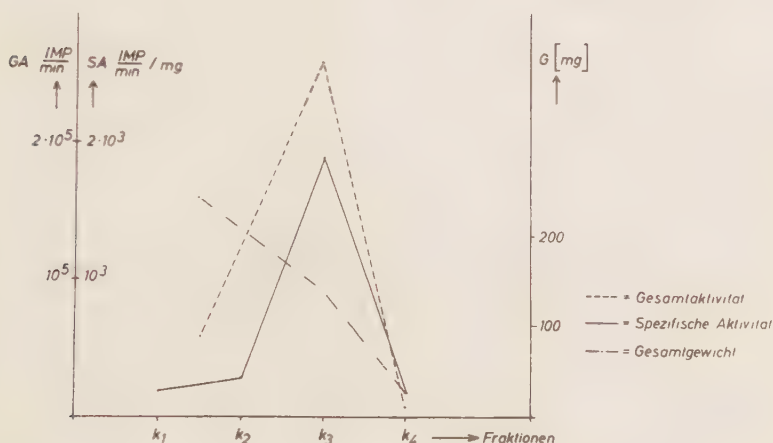


ABBILDUNG 13

Gesamtradioaktivität, Spezifische Radioaktivität und Gesamtgewichte in den alkalischen Extrakten (K_1 - K_4) von Calliphora-Puparien

Um die Zusammensetzung und die Eigenschaften der Fraktionen von c) K_1 - c) K_4 näher kennenzulernen, wurde die quantitative Aminosäurezusammensetzung im Aminosäureanalysator nach Grassmann-Hannig untersucht. Aus den erhaltenen Werten wurde der Proteingehalt der Extrakte K_1 bis K_4 berechnet und mit Ergebnissen von Gesamtstickstoffbestimmungen, die nach Kjeldahl durchgeführt wurden, verglichen. Da der festgestellte Gesamtstickstoff nicht nur aus den Aminosäuren stammt, liegen die aus den Mikromolmengen berechneten Proteingehalte zum Teil bedeutend tiefer.

TABELLE 14

Gesamtstickstoff und Proteingehalt
der alkalischen Extrakte (K₁ bis K₄) von Calliphorapuparien

	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄
a) Best. Ges. Stickstoff	9,6 %	8,1 %	7,4 %	-
b) Aus a) berechnetes Gesamtprotein	59,8 %	50,3 %	46,2 %	-
c) Aus Aminosäureanalyse berechnetes Gesamt- protein	50,6 %	36,4 %	19,9 %	5,97 %

TABELLE 15

Quantitative Aminosäureanalyse
der alkalischen Extrakte abgeworfener Puparien von Calliphora
Mol % (berechnet aus den absoluten Mol-Mengen)

	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄
Lysin	7,0	4,5	5,5	6,4
Histidin	6,9	7,4	6,9	8,4
Arginin	5,9	2,1	-	-
Asparaginsäure	13,3	13,8	12,4	9,4
Threonin	3,5	2,1	-	-
Serin	3,8	2,0	-	-
Glutaminsäure	16,7	20,0	19,3	20,8
Prolin	5,7	8,7	12,6	22,5
Glycin	2,9	3,2	2,8	2,2
Alanin	4,9	6,0	6,1	5,6
Valin	7,2	10,1	11,0	20,4
Methionin	0,9	-	3,6	-
Isoleucin	4,5	4,6	3,7	-
Leucin	6,3	6,1	6,1	4,6
Tyrosin	5,7	5,5	5,6	-
Phenylalanin	5,1	4,0	4,4	-
	100,3	100,1	100,0	100,3

Die radioaktive N-haltige Substanz, die nicht ninhydrinpositiv ist, bleibt bei der Aminosäureanalyse im oberen Teil der Säulen hängen. Ausser den Aminosäuren sind weitere ninhydrin-positive Verbindungen nicht festzustellen.

Die Aminosäurezusammensetzung zeigt, dass Arginin, Threonin und Serin von K₁ bis K₂ abnehmen und in der radioaktiv stärk-

sten Fraktion K_3 nicht mehr vorhanden sind. Prolin und Valin dagegen nehmen von K_1 bis K_4 stark zu. Die restlichen Aminosäuren bleiben mehr oder weniger konstant.

In Abb.14 und 15 wird der Gehalt einiger Aminosäuren ξ phisch miteinander verglichen.

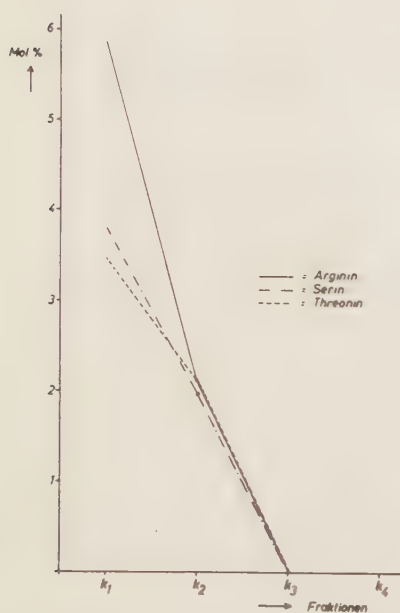


ABBILDUNG 14

Gehalt an Arginin, Serin und Threonin in Cuticulaextrakten

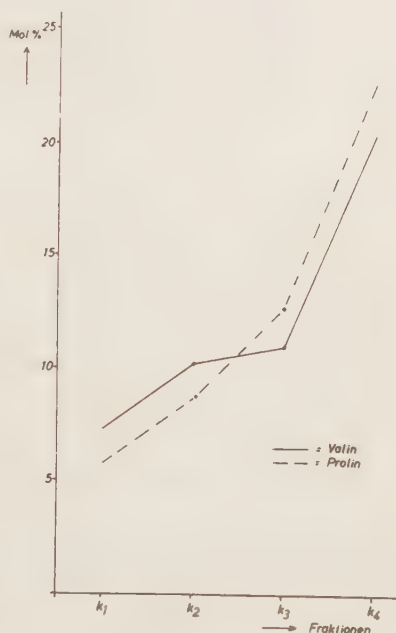


ABBILDUNG 15

Gehalt an Valin und Prolin in Cuticulaextrakten

Von den Fraktionen K_1 , K_2 und K_3 wurden drei gleiche Proben entnommen, hydrolysiert und papierchromatographiert. Die dunkelbraunen, von Aminosäuren und Kohlenhydraten befreiten Substanzen im Startpunkt wurden isoliert und der Gesamtstickstoff nach Kjehldahl bestimmt.

	K_1	K_2	K_3
Gesamtstickstoff	3,26 %	3,01 %	3,41 %

Die Ähnlichkeit der drei Stickstoffwerte untereinander deutet darauf hin, dass es sich in allen Fraktionen um die gleiche stark radioaktive Substanz handelt.

Zusammenfassend zeigt die Fraktion c) K_3 folgende Eigenschaften:

1. Höchste spez. Radioaktivität
2. Höchste Gesamtaktivität
3. Intensivste Dunkelbraunfärbung
4. Geringer Proteingehalt
5. Fehlen von Arginin, Serin und Threonin
6. Hoher Gehalt an einer sauerstoffhaltigen Komponente.

11. Isolierung einer stark radioaktiv angereicherten Proteinfraktion aus abgeworfenen Puparien von Calliphora

Bei der Suche nach Anreicherungsmöglichkeiten der Radioaktivität wurde festgestellt, dass aus sämtlichen alkalischen Proteinextrakten von Puparien mit Hilfe von Salzsäure bei pH 1-5 eine flockige, dunkelbraune Substanz ausgefällt werden konnte; durch deren Entfernung wird die Farbintensität und Radioaktivität der Lösung bedeutend geringer. Das gefällte Produkt liess sich unter pH 1 und über pH 6 wieder in Lösung bringen. Zwei gefällte, proteinhaltige Fraktionen wurden näher untersucht:

Besonders deutlich wurde die Radioaktivitätsanreicherung, als man in der schon 1901 Imp/min/mg zeigenden Fraktion c) K_3 (siehe Seite 40) die Fällung durchführte: Man erhielt eine etwa 10-fache Anreicherung gegenüber der Ausgangsfraktion.

Aus einem alkalischen Gesamtextrakt von abgeworfenen Puppen wurde die Fällung durchgeführt. Ein Teil der isolierten Substanz wurde analysiert. Es ergab sich folgende Zusammensetzung:

C = 53,00 %	H = 5,69 %
N = 9,78 %	O = 31,53 % (Diff.)
Summe: 100,00 %	

Die quantitative Aminosäureanalyse der gefällten Proteinfractionen zeigte die in Tabelle 16 aufgeführte Zusammensetzung.

TABELLE 16

Quantitative Aminosäureanalyse der gefällten Proteinfraction
aus abgeworfenen Calliphora-Puparien

	abs. Molmenge	abs. Molmenge x mol. gew. rest	Mol %
Lysin	0,185	0,023,7	8,0
Histidin	0,150	0,020,6	6,8
Arginin	-	-	-
Asparaginsäure	0,215	0,024,7	8,3
Threonin	-	-	-
Serin	-	-	-
Glutaminsäure	0,437	0,056,4	19,0
Prolin	0,552	0,053,5	18,0
Glycin	0,189	0,010,8	3,6
Alanin	0,240	0,017,0	5,7
Valin	0,363	0,035,9	12,1
Methionin	0,070	0,009,2	3,1
Isoleucin	0,080	0,009,0	3,0
Leucin	0,196	0,022,2	7,5
Tyrosin	-	-	-
Phenylalanin	-	-	-
Ammoniak	0,814	0,013,8	4,5

Es fällt auf, dass Arginin, Threonin, Serin, sowie Tyrosin und Phenylalanin völlig fehlen und dass der Gehalt an Prolin wie in der Fraktion c) K₃ sehr hoch ist (siehe Seite 42).

Aus der quantitativen Aminosäureanalyse wurde ein Gesamtproteingehalt von 14,8 % errechnet. Man ersieht daraus, dass sich in der gefällten Komponente 85,2 % unbekannte Cuticula-Anteile befinden. Es können weder Kohlenhydrate noch ninhydrinpositive Substanzen nachgewiesen werden.

Wird die oben isolierte Proteinfraction vor der Hydrolyse hydroxyliert, dann erhöht sich der Anteil an freigesetztem Ammoniak von 4,5 % auf 17,1 %. Durch die Hydroxylierung muss eine Abspaltung von Ammoniak aus irgendeiner Bindung erleichtert worden sein, denn bei direkter Hydrolyse ganzer Puparien von Calliphora werden nur 6,1 % Ammoniak festgestellt.

12. Methylierung von alkalischen Cuticulaextrakten

Da angenommen wurde, dass die radioaktive Substanz, d.h. die für die Sklerotisierung verantwortliche Verbindung, in chinoider Form vorliegt, wurden verschiedene Vorbehandlungen zur Stabilisierung des zu hydrolysierenden Proteinextraktes für vorteilhaft gehalten: Dafür kamen Methylierungen, Acetylierungen, Reduktion, Oxydation, Hydroxylierung und sonstige Reaktionsarten in Frage. Diese Versuche sind in folgenden Beispielen unter Ziffer 13 bis 15 aufgeführt.

Alkalische Proteinextrakte wurden in methanolischer Lösung mit Diazomethan methyliert (60) und anschliessend hydrolysiert. Nach papierchromatographischer Auftrennung erhielt man 4 radioaktive Banden mit den RF-Werten: 0,84; 0,55; 0,22; und 0,12.

Die zur Reinigung durchgeführte Rechromatographie führte zu grossen Verlusten. Eine Identifizierung dieser Substanzen war wegen ihrer grossen Zersetzlichkeit nicht möglich.

13. Acetylierung und Diazotierung von alkalischen Cuticulaextrakten

Um die Substitutionsmöglichkeiten an dem angenommenen chinoiden Folgeprodukt des Dopamins zu untersuchen, wurde die Thiele-Reaktion durchgeführt. Diese bietet einen Weg zur Darstellung von Hydroxy-Hydrochinon-Triacetaten. Dabei wird der chinoider Ring in einen benzoiden umgewandelt. Die Reaktion tritt nur ein, wenn eine p-Stellung unbesetzt ist. Nach Hydrolyse erhielt man ein praktisch nicht verändertes Produkt.

Diazotierungs- und Kopplungsversuche mit o-Phenylen-Diamin verliefen ebenfalls erfolglos.

14. Oxydation von alkalischen Cuticulaextrakten

Es wurden Versuche durchgeführt, bei denen festgestellt werden sollte, ob durch Oxydation oder Reduktion die Cuticulaextrakte so verändert werden können, dass eine bessere Bearbeitung und eine Isolierung der radioaktiven Substanzen ermöglicht würde.

Alkalische Proteinextrakte wurden bei pH 14 bzw. pH 10 mit 5 %iger Kaliumpermanganat-Lösung (bis zur Entfärbung) oxydiert und hydrolysiert. Es trat bald wieder eine Braunfärbung ein. Die entstandenen öligen Produkte konnten nicht bearbeitet werden.

15. Reduktion von alkalischen Cuticulaextrakten

Reduktionsversuche mit Zinkpulver in saurem, alkalischem und neutralem Milieu führten bei Zimmertemperatur, bei Erwärmung schneller zu einer Entfärbung brauner Proteinextrakte von abgeworfenen Calliphorapuparien. Jedoch sind die entstandenen Produkte äusserst sauerstoffempfindlich und von öligter Konsistenz. Auch nach sofortiger Hydrolyse tritt schnell eine Braunfärbung wieder ein.

16. Hydroxylierung alkalischer und saurer Cuticulaextrakte

Die Hydroxylierungsversuche sollten durch Einführung von Hydroxylgruppen das vorhandene chinoide System in ein benzoides umwandeln. Doppelbindungen können durch Wasserstoffperoxyd und einen Katalysator oder UV-Licht in cis-Glykole umgewandelt werden. Dabei kann es je nach Katalysator und Reaktionsdauer auch zum weiteren Abbau bis CO_2 kommen.

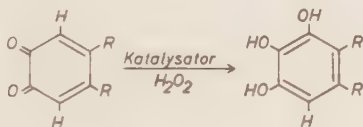


ABBILDUNG 16

Hydroxylierung eines Chinons

Die Hydroxylierung wurde sowohl nach alkalischer, als auch nach salzsaurer Extraktion der Cuticula durchgeführt. Auf diese Weise sollten evtl. Unterschiede festgestellt werden; vor allem war bekannt, dass der Tyrosinmetabolit besonders alkalienempfindlich ist. Bei der alkalischen Extraktion blieben fast farblose Puparien zurück, während bei der salzsauren Extraktion, selbst nach längerer Reaktionsdauer, die Farbe der Puparien von braun in schwarzbraun überging.

Die Cuticulaextrakte wurden mit 5 %igem H_2O_2 unter Einwirkung verschiedener Katalysatoren hydroxyliert.

- a) H_2O_2 und UV-Licht (61)
- b) H_2O_2 und Eisessig
- c) H_2O_2 und 1 %ige OsO_4 (62)

In allen 3 Fällen schlug die Farbe der Lösungen von braun in gelb um. Bei längerer Reaktionszeit wurde die Lösung farblos, und es ging auch ein sehr grosser Teil der Radioaktivität verloren. Es wurde radioaktives CO_2 nachgewiesen.

Bei Einwirkung von Osmiumtetroxyd als Katalysator trat die Gelbfärbung besonders schnell ein. Die Bestrahlung mit UV-Licht erwies sich als die schonendste Methode. Bei Hydrolyse blieb die bestrahlte Lösung klar.

Die Ergebnisse der Papierchromatographischen Auswertung einer Versuchsreihe wurde in Tabelle 17 zusammengefasst:

TABELLE 17

Ergebnisse der Hydroxylierung von Cuticulaextrakten

Hydroxylierung bei pH	Bestrahlungsdauer Std.	RF-Wert d. radioakt. Subst.				
		1.	2.	3.	4.	5.
alkalische Extrakte						
1- 2	46		0,85	0,61	0,24	0,14
5- 6	88		0,84	0,62	0,22	
6	44		0,86	0,60	0,23	
7	60		0,80	0,59	0,24	
9	42		0,80	0,60	0,24	
1- 2	15		0,92	0,66	0,28	
5- 6	20		0,90	0,65	0,25	
7	24		0,92	0,64	0,28	0,15
10-11	20		0,90	0,66	0,28	0,15
saure Extrakte						
7	20	0,95	0,85	0,64	0,25	0,15

Bei kürzeren Bestrahlungszeiten war die Ausbeute der Radioaktivität wesentlich höher, so dass die Substanzen rechromatographiert und weiter untersucht werden konnten.

Aus Tabelle 17 ersieht man, dass die Radioaktivität sich bei der Hydroxylierung saurer und alkalischer Cuticulaextrakte auf dieselben vier Substanzen verteilt. Bei einem weiteren Versuch wurde ein salzsaurer Cuticulaextrakt vor der Hydroxylierung mit Acetylchlorid acetyliert. Nach Aufarbeitung ergaben sich auch in diesem Falle keinerlei Differenzen zu den nicht acetylierten Extrakten. Die Hauptaktivität befindet sich bei den RF-Werten 0,85 und 0,64.

Eine ungefähre quantitative Berechnung der vier Substanzen bei Bestrahlungszeiten von 24 Stunden ergab folgendes Verhältnis:

	RF-Werte
alkalischer Cuticulaextrakt:	47 : 30 : 10 : 13
saurer Cuticulaextrakt:	35 : 25 : 11 : 16

Das quantitative Verhältnis der vier Substanzen zueinander ändert sich bei den kürzeren Bestrahlungsdauern kaum, bei längeren (über 60 Stunden) erhöht sich der Anteil der beiden kürzer laufenden Substanzen.

Die Substanz mit dem höchsten RF-Wert (0,85) wurde extrahiert und mehrmals rechromatographiert. Die Mikroanalyse ergab folgende Zusammensetzung:

C = 40,05 %	H = 5,50 %
N = 1,38 %	O = 53,07 % (Diff.)

Die Analysenwerte deuten auf ein Atomverhältnis:



Die Substanz ist fast stickstofffrei (der Stickstoff stammt sicherlich von Verunreinigungen).

Im I. R. -Absorptions-Spektrum können nur Carbonylbanden festgestellt werden. Durch papierchromatographische Untersuchung (RF-Wert), Alkalilöslichkeit und Nachweis von Pyrrol bei der Zinkstaubdestillation des Ammoniumsalzes konnte diese Substanz als Bernsteinsäure identifiziert werden.

17. Hydroxylierung der radioaktiven, im Startpunkt verbleibenden Substanzen

Die in Teil II 6. aus dem Startpunkt isolierten radioaktiven Substanzen sind vom Chitin- und vom Protein der Cuticula abgetrennt worden. Sie wurden mit Wasserstoffperoxyd unter UV-Licht hydroxyliert, um etwaige Unterschiede -ebenfalls dieser Reaktion unterworfenen anderen Produkten der Cuticula- festzustellen.

Die papierchromatographische Auswertung ergab sowohl bei abgeworfenen als auch bei ein Tag alten Puparien zwei radioaktive Substanzen mit den RF-Werten 0,25 und 0,52.

Wird also hydrolysiert und dann erst hydroxyliert, so erhält man nicht vier, sondern nur zwei radioaktive Produkte (siehe Abb.17).

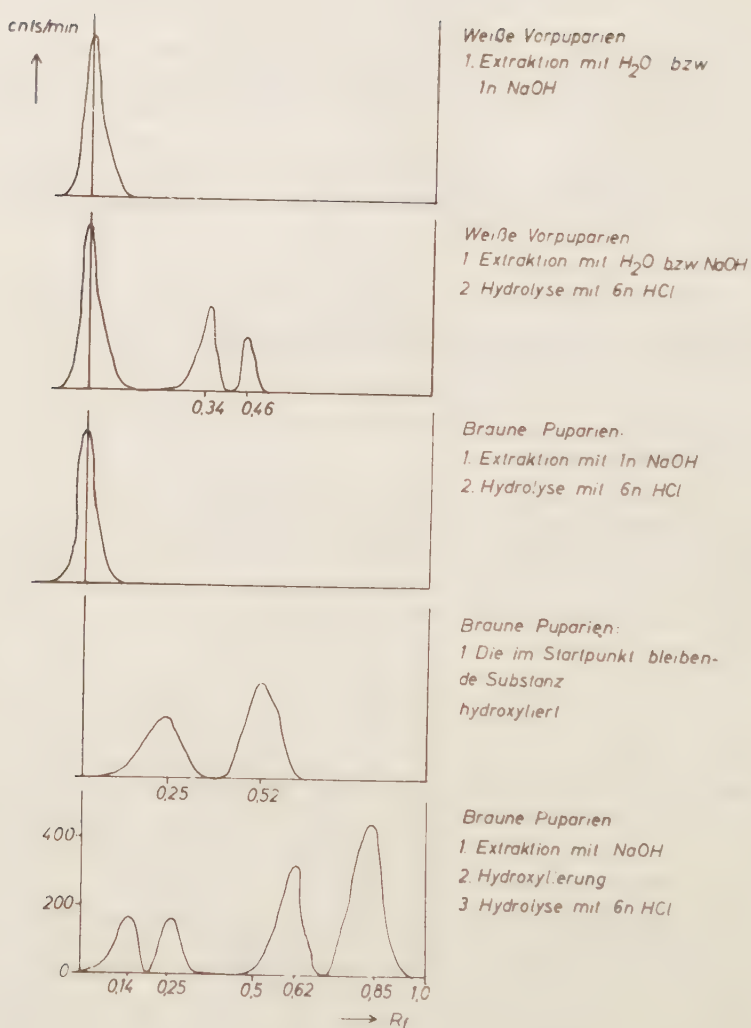


ABBILDUNG 17

Die papierchromatographische Verteilung der Radioaktivität bei verschiedenen Bearbeitungen weisser Vorpuparien und brauner Puparien

18. Hydroxylierung abgeworfener Puparien

Es wurde eine Versuchsreihe von Hydroxylierungen intakter Cuticula mit UV, Osmiumtetroxyd und Eisessig in wasserstoffperoxydhaltigen Lösungen durchgeführt. Es war ein Versuch, die alkalischen und salzsaurigen Extraktionen von *Calliphora*-Puparien zu umgehen. Diese Extraktionen sind notwendig, um Proteine und sonstige lösliche Substanzen vom Chitin abzutrennen, können aber andererseits die Substanzen verändern.

TABELLE 18
Hydroxylierung ganzer Puparien

Katalysator	Reaktionszeit Std.	gelöste Cuticulasubstanz %
1. UV-Licht	80	54
2. Eisessig	6	67
3. OsO ₄	2	70

Die mit Eisessig und Osmiumtetroxyd herausgelösten Substanzmengen entsprachen einer 50-60 Stunden dauernden alkalischen Extraktion. Jedoch traten bei diesen Versuchen grosse Verluste an Radioaktivität auf, die zurückbleibenden Puparien waren weiss und zeigten keine Radioaktivität mehr.

Hydrolyse und Eindampfung des Extrakts lieferten ziegelrote Substanzen. Bei Papierchromatographie blieben diese im Startpunkt. Sie enthielten die gesamte Radioaktivität und verfärbten sich nach kurzer Zeit ins violette. (Die ausserordentlich geringen Substanzmengen erlaubten keine weiteren Untersuchungen.)

III. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

1. Hochmolekulare Strukturbildner der Cuticula

Chitin und Protein sind die Hauptbestandteile der Insektencuticula. Das quantitative Verhältnis von Protein zu Chitin (14) variiert bei den verschiedenen Insektenarten von 1 : 1 bis 20 : 1, es beträgt bei *Calliphora* etwa 4 : 3.

Die Pupariumbildung der *Calliphora*larven besteht in der Sklerotisierung der Cuticula, die mit einer Veränderung der physikalischen Eigenschaften und der chemischen Struktur des Proteins, des Chitins und anderer Komponenten verbunden ist.

Die Chitinkomponente der Cuticula zeigt bei Larven und Puparien einen unterschiedlichen räumlichen Aufbau. Fraenkel und Rudall sowie Richards zeigten mit Hilfe von Röntgenuntersuchungen eine Orientierung der Chitinkristallite in den sklerotisierten Puparien. Bei eigenen Extraktionen wurde festgestellt, dass das Puparium auch nach Extraktion der Proteine seine Form beibehält. Das Chitin ist eine Gerüstsubstanz und vielleicht wird durch die Kontraktion der Larven zu Beginn der Puparisierung eine Kopplung zwischen Chitin und Protein sowie anderen Substanzen und Umbauprodukten des Tyrosins in der Cuticula gefördert.

Die Proteine der Insekten-Cuticula unterscheiden sich von anderen Skleroproteinen durch das Fehlen von Cystein und Cystin.

Eigene Untersuchungen der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der Proteine ganzer Puparien von *Calliphora* haben ergeben, dass sich diese aus 17 Aminosäuren zusammensetzen. Durch Extraktion mit Natronlauge gelang eine quantitative Abtrennung des Proteins vom Chitin; in den Extrakten wurden die gleichen Aminosäuren identifiziert. Andere Autoren haben fast die gleiche quantitative Zusammensetzung bei anderen Insekten festgestellt.

Im Gegensatz zu Hackman, der in braunen sklerotisierten Puparien kein Lysin fand, wurde in eigenen Untersuchungen bei *Calliphora* ein Gehalt von 3,9 % Lysin festgestellt. Somit wäre die von verschiedenen Autoren postulierte Bedeutung der ϵ -Aminogruppe des Lysins bei der Kopplung an chinoide Sklerotisierungssubstanzen noch weniger gesichert als bisher.

Auffallend ist der hohe Gehalt an Glutaminsäure und Asparaginsäure. Hackman vermutet, dass die Carboxylgruppen der Asparaginsäure mit nichtacetylierten Aminogruppen des Chitin-Glucosamins reagieren.

Besonders interessant sind die Löslichkeitsunterschiede zwischen Larvencuticula und Puparien (siehe Tab. 7). Während der Puparisierung gehen die zunächst wasserlöslichen Proteine neue stabilere Bindungen ein und können dann nur noch durch 1 n NaOH in Lösung gebracht werden. Möglicherweise handelt es sich um Esterbindungen mit dem Chitin, die bei dieser Behandlung gespalten werden.

Die aus Larvencuticula kurz vor der Verpuppung darstellbaren klaren, wässrigen Extrakte werden nach einiger Zeit durch bisher unbekannte Faktoren zunächst in violette und dann in dunkelbraune, klare Lösungen verwandelt. Diese sind in ihren chemischen Eigenschaften den alkalischen Cuticula-Extrakten aus abgeworfenen Puparien sehr ähnlich. Eine Braunfärbung ist also auch ohne eine Verhärtung der Cuticula möglich und die dafür verantwortlichen Substanzen sind schon vor der Pupariumbildung vorhanden. Die Verhärtung

des Pupariums nach der Verpuppung ist primär eine Folge der Kontraktion, der Austrocknung des Chitinsperiates und der festgestellten starken Dehydratisierung.

Bei Puparien findet man einen etwas geringeren Stickstoffgehalt als in der Larvencuticula, wie auch von Frankell festgestellt wurde. Berücksichtigt man die auf Grund der Stickstoffbestimmungen, der quantitativen Analysenresultate und der Extraktionsversuche bestimmte Verteilung des Chitins und des Proteins, so erhält man für die Larvencuticula 16,4 % und für abgeworfene Puparien 24,7 % einer dritten untersuchten Fraktion. Sie enthält die gesamte in der Cuticula wiedergefundene Radioaktivität und ist, wie wir später noch diskutieren werden, mit einer stickstoffhaltigen Substanz gesättigt. Der absolute Chitinsgehalt bleibt im Gegensatz zu den anderen Fraktionen (siehe Abb. 11 und 12) unverändert. Die Zuführung der für die Sklerotisierung notwendigen Substanzen in die Cuticula findet in einem kurzen Zeitraum nach der Larvenkontraktion statt. Das Trockengewicht der Cuticula nimmt dadurch um 31 % zu.

2. Die Sklerotisierungssubstanzen

Auf Grund der Isolierung einiger Phenole und Phenolcarbonsäuren, die als Stoffwechsel-Produkte des Tyrosins angesehen wurden, waren Pryor, Heckman, Mason und andere Autoren der Meinung, dass diese Verbindungen enzymatisch zu den entsprechenden Chinonen oxydiert werden, die durch Kopplung an das Cuticula-Protein die Sklerotisierung hervorrufen (Denell).

Die Grundkonzeption -Sklerotisierung durch Tyrosinmetaboliten- konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Jedoch sind die in eigenen Arbeiten und auch von anderen Autoren isolierten phenolischen Carbonsäuren sicherlich nicht kurz vor der Verpuppung gebildet worden. Denn bei Markierung mit radioaktivem Tyrosin wurde nach Hydrolyse keine der erwähnten Substanzen als radioaktive Verbindung isoliert; nur Dopamin und Tyrosin konnten nach Hydrolyse aus weissen Vorpuppen-Cuticula in radioaktiver Form isoliert werden.

Das Dopamin geht in den braunen Puparien weitere Verbindungen ein und liegt daher nicht mehr im Originalzustand vor.

Karlson und Benzerla haben Acetyldopamin als Umbauprodukt des Tyrosins isolieren können. Dass diese Substanz an der Sklerotisierung massgeblich beteiligt ist, konnte in eigenen Versuchen durch die Isolierung aus der Cuticula weisser Vorpuppen bestätigt werden. Sie liegt dort jedoch schon in gebundener Form vor und muss durch Hydrolyse freigesetzt werden.

Das ebenfalls von Karlson und Benzerla isolierte O-Glucosid des Acetyldopamins wurde als Speichersubstanz angesehen.

Eine Beteiligung dieser Verbindung an der Sklerotisierungsreaktion ist auf Grund der eigenen Untersuchungen nicht ausgeschlossen: Die nach Hydrolyse intensiv braun gefärbter Proteinfractionen auftretenden, nicht chromatographierbaren Substanzen (die auch den grössten Teil der Radioaktivität enthalten) haben einen hohen Sauerstoffgehalt, zeigen im UV-Licht Hydroxylbanden und sind methylierbar. Kohlenhydrate können nicht nachgewiesen werden. Es handelt sich hier vielleicht um abgebaute Glucose des oben erwähnten O-Glucosids des Acetyldopamins.

Versuche, das von Dennell angegebene Diamindiphenol zu isolieren, waren erfolglos: Eine entsprechende radioaktive Substanz war nicht zu finden. Die von Dennell vorgeschlagene Beteiligung paradiphenolischer Verbindungen kommt auch wegen der geringen Einbauquoten von Hydrochinon nicht in Betracht.

3. Die sklerotisierte Cuticula

Nach Injektion von generell markiertem Tyrosin werden bis zu 85 % der insgesamt wiedergefundenen Radioaktivität in der sklerotisierten Cuticula wiedergefunden.

Bei der Extraktion mit 1 n Natronlauge geht die gesamte Radioaktivität in Lösung. Die Farbintensität dieser Lösungen geht der Höhe der Radioaktivität parallel.

Erst nach Hydrolyse wurden etwa 95 % der sklerotisierten Cuticula dialysierbar. Das heisst, dass durch die Hydrolyse aus dem Sklerotin Bruchstücke mit einem maximalen Molekulargewicht von etwa 600 entstanden sind.

Um Melanine kann es sich bei den gefärbten Extrakten nicht handeln, weil diese ganz andere Lösungseigenschaften haben (s. u.). Melanine sind wohl in der Calliphora-Epicuticula in geringem Masse vorhanden. Sie bleiben aber nach salzsaurer Hydrolyse im Rückstand zurück.

Durch fraktionierte alkalische Extraktion sklerotisierter Calliphorapuparien konnten 80 % der Radioaktivität in einer Fraktion angereichert werden, die auch die höchste spezifische Radioaktivität zeigte (vgl. Seite 40). Der Proteingehalt dieser Fraktion, ermittelt aus der quantitativen Aminosäureanalyse, betrug 20 %. Eine ähnliche Fraktion konnte direkt aus einem alkalischen Extrakt ohne vorherige Fraktionierung durch Ansäuern auf pH 3 ausgefällt werden. Hier beträgt der Proteingehalt sogar nur 14,8 %. In diesem Protein fehlen Arginin, Threonin und Serin. Da keine weiteren ninhydrinpositiven Substanzen festgestellt wurden, müssen die α -Aminogruppen dieser Aminosäuren bei der Kopplung der Tyrosinmetaboliten eine wesentliche Rolle spielen.

Bei den restlichen 80 bzw. 85,2 % beider Aufarbeitungen handelt es sich um ein stark sauerstoffhaltiges, kohlenhydratähnliches Produkt, das immer in Verbindung mit den radioaktiven Metaboliten auftritt.

Auch der hohe Sauerstoffgehalt der nach Hydrolyse im Startpunkt bleibenden radioaktiven Substanz deutet auf ein Kondensationsprodukt zwischen einem Tyrosinmetaboliten und einem Kohlenhydrat hin. Es könnte sich um das Produkt einer Aldolkondensation handeln (siehe Seite 33).

K. Heyns (63) hat in Modellreaktionen festgestellt, dass durch Umsetzung von Aminosäuren oder Aminen mit Kohlenhydraten stark braun gefärbte Produkte entstehen. Diese nichtenzymatische Bräunungsreaktion, bei der die α -Aminogruppen der Aminosäuren über komplizierte Reaktionsfolgen (Amadoriumlagerung eines N-Glykosids) reagieren, kann durchaus in der Calliphora-Cuticula stattgefunden haben.

Weitere Versuche galten dem Ziel, die in der Cuticula eingebauten radioaktiven Metaboliten anzureichern, von den übrigen Komponenten abzutrennen und zu isolieren. Es ergaben sich grosse Schwierigkeiten, weil das Sklerotin der Puparien einerseits gegen chemische Eingriffe recht widerstandsfähig ist, andererseits die gesuchten Substanzen äusserst zersetzlich sind. Der eingebaute Tyrosinmetabolit ist verschiedenartige Bindungen eingegangen; sind sie gelöst, dann ist das Spaltprodukt instabil und polymerisiert leicht. Ausserdem besteht immer die Gefahr, dass bei chemischen Eingriffen in Lösungen, in denen sich Proteine, Kohlenhydrate, Phenole und Chinone nebeneinander befinden, Kunstprodukte entstehen.

Versuche, schützende Gruppen einzuführen, erwiesen sich als wenig erfolgversprechend. Extrakte veränderten sich bei der Thiele-Reaktion nicht; wahrscheinlich ist der chinoide Metabolit des N-Acetyldopamins an 4 Stellen im Ring substituiert. Die Methylierung ergab mit sehr geringer Ausbeute 4 braune radioaktive Umwandlungsprodukte. Vermutlich sind dabei Hydroxylgruppen der sauerstoffhaltigen Substanz methyliert worden.

Interessante Ergebnisse lieferten die Hydroxylierungsversuche. Sowohl bei alkalischen als auch bei salzsauren Extrakten wurden durch Hydroxylierung und anschliessende Hydrolyse vier radioaktive Substanzen erhalten. (Wurden die nach Hydrolyse isolierten Produkte hydroxyliert, dann erhielt man nur 2 radioaktive Abbauprodukte). Keines der vier radioaktiven Produkte ist ninhydrinpositiv, es sind somit keine freien Aminogruppen vorhanden. Jedoch tritt bei quantitativer Aminosäureanalyse (ohne wesentliche Verluste an Aminosäuren) eine sehr starke Ammoniakentwicklung ein,

die auf eine Beteiligung von NH_2 -Gruppen an Bindungen des Tyrosinmetaboliten hindeutet. Durch die Hydroxylierungen können N-Bindungen in -NH-Bindungen umgewandelt und bei Hydrolyse als Ammoniak abgespalten werden. Solche Bindungen kann man sich durch Kondensation zwischen den Ketogruppen des chinoiden Tyrosinmetaboliten und den freien Aminogruppen des Proteins oder des Chitins entstanden denken. Das covalent am Chitin gebundene Protein enthält keine freien Aminoendgruppen mehr.

Eine der radioaktiven Substanzen, die nach Hydroxylierung und Hydrolyse im Papierchromatogramm den höchsten RF-Wert von 0,85 zeigte, wurde isoliert und als Bernsteinsäure identifiziert. Ihr Anteil an der Gesamtradioaktivität der 4 Substanzen beträgt bis 47 %. Die C_4 -Gruppierung stammt entweder aus dem Phenylring oder aus Phenylring + Seitenkette des eingesetzten generell markierten radioaktiven Tyrosins. Bei der Hydroxylierung wird der später chinoide Ring in den beiden Doppelbindungen oxydativ gespalten. Obwohl bisher kein Chinon als Sklerotisierungssubstanz isoliert worden ist, kann hierdurch als bewiesen gelten, dass tatsächlich ein chinoider Metabolit des Tyrosins an der Sklerotisierung beteiligt ist.

Bei der Hydroxylierung ganzer, brauner Puparien lösen sich (im Gegensatz zu lange dauernder alkalischer Extraktion) bis zu 70 % der nicht chitinartigen Substanzen in kurzer Zeit in Wasser. Parallel zur Addition von Hydroxygruppen an die Doppelbindung des Chinons und der anschliessenden Spaltung verschwindet die Braunfärbung. Das Chitin wird dabei vom Protein abgetrennt und man erhält Verhältnisse, die denen der weissen Larvencuticula ähneln. Daraus muss gefolgert werden, dass der chinoide Tyrosinmetabolit neben der Vernetzung der Cuticulaproteine und der Farbstoffbildung auch für die Bindung an das Chitingerüst verantwortlich ist.

4. Der Sklerotisierungsprozess

Für den Gesamtablauf der Pupariumbildung lässt sich folgendes Bild entwerfen: Als vorbereitende Vorgänge sind die Bereitstellungen der Sklerotisierungssubstanz und der Diphenoloxydase anzusehen; sie werden vom Ecdyson kontrolliert. Nach Kontraktion der Cuticula, bei der eine Ausrichtung der Chitinkristallite eintritt, wandert der für die Sklerotisierung verantwortliche Tyrosinmetabolit in die Cuticula und geht peptidische oder glykosidische Bindungen mit dem Protein oder den Kohlenhydraten ein (möglicherweise als O-Glucosid).

Bei diesem Stadium der weissen Vorpuppen handelt es sich nur um einen kurzfristigen Übergangszustand. Die zunächst zu

einem grossen Teil wasserlöslichen, nicht chitinartigen Komponenten der Cuticula beginnen wasserunlöslich zu werden.

Die im Praesklerotin eingebauten, noch farblosen phenolischen Metaboliten werden dann durch eine Diphenoloxydase zu Chinonen oxydiert. Dadurch entstehen neue reaktionsfähige Keto-Gruppen. Der Oxydation geht die Braunfärbung der Puppencuticula parallel. Die Erhärtung der Puparien ist primär als eine Folge der Dehydratisierung der Cuticula nach der Verpuppung anzusehen.

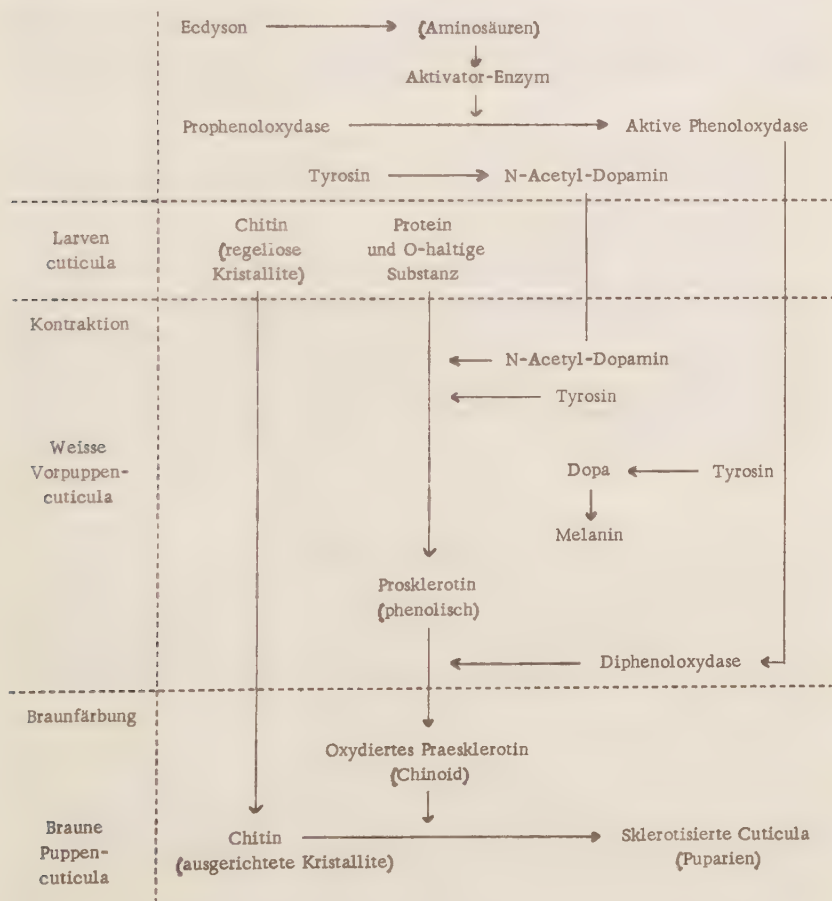


ABBILDUNG 18
Schema der Sklerotisierung

C. EXPERIMENTELLER TEIL

1. EINBAUVERSUCHE

Calliphoramaden, die kurz vor der Verpuppung standen, wurden mit Äther betäubt (besser als mit CO_2) und generell radioaktiv markiertes Tyrosin oder Dopamin mit einer Desaga-Mikro-Injektionsspritze injiziert.

Es wurden je Tier 0,005 ml der in destilliertem Wasser oder Ringerlösung gelösten Substanzen injiziert. Dabei waren je nach Versuch 12.000 bis 116.000 counts in der angegebenen Menge zu messen.

Nach einer bestimmten Zeit wurde die Cuticula abpräpariert, kurz in Wasser und Petroläther gewaschen und vorsichtig über P_2O_5 getrocknet. Zu einem Teil liess man die Imagines schlüpfen und verarbeitete die abgeworfenen Puparien.

Radioaktive Lösungen wurden auf Plättchen aufgetragen und vorsichtig eingetrocknet oder nach der Folch-van-Slyke-Methode durch Nassverbrennung und Messung des Bariumcarbonats in einem Methandurchflusszähler bestimmt. Die Messungen der Radioaktivität auf Papierchromatogrammen geschah in einem Papierchromatographen mit 2 Endfensterzählrohren oder einem Methandurchflusszähler. Die Geräte stammen von der Firma Friesseke und Höpfner.

2. EXTRAKTIONEN

Die Extraktionen fester Substanzen wurden im Soxhlet Apparat und die von Lösungen in Perforatoren verschiedener Grösse durchgeführt. Zur Entfettung der zermörserten und der ganzen Puparien und Larvencuticeln wurde Petroläther angewendet.

Für die quantitative Abtrennung des Chitins von den übrigen Cuticula-Substanzen mit Hilfe von 5 n Natronlauge genügt ein einfacher Schliffkolben mit aufgesetztem Kugelkühler, Zum Heizen ist ein Glycerinbad gut geeignet. Normalerweise wurde die 20-fache Menge an Lösungsmitteln zugegeben und 60 Stunden bei 50°C extrahiert.

Die fraktionierte Extraktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

H ₂ O-Extraktion:	30 Stunden bei 21°C
Na ₂ SO ₄ -Extraktion:	30 Stunden bei 21°C
(NH ₂) ₂ CO-Extraktion:	30 Stunden bei 21°C
nNaOH-Extraktion:	je 15 Stunden bei 50°C
(K ₁ bis K ₅)	

Zur Elution von Substanzen aus Papierchromatogrammen wurden die Stellen herausgeschnitten, zerkleinert und mit den entsprechenden Lösungsmitteln extrahiert. Leicht siedende Lösungsmittel wurden über eine normale Brücke entfernt. Wässrige Lösungen wurden meist mit Hilfe eines Rotationsverdampfers eingeeengt oder zur Trockne eingedampft. Die Temperatur des Heizbades sollte dabei 30°C möglichst nicht übersteigen.

3. HYDROLYSEN

Bei den Hydrolyseversuchen wurde ebenfalls die 20-fache Menge an 6 n Salzsäure, 30 %ige Schwefelsäure oder 6 n Natronlauge genommen. Es wurde 20 Stunden bei 38°C hydrolysiert. Für die alkalischen Hydrolysen wurde anstatt eines Schliffkolbens eine Polyäthylenflasche benutzt. Die reduktive, alkalische Hydrolyse wurde mit 5,5 n Natronlauge, die SnCl₂ enthielt, durchgeführt.

Die Säuren wurden durch Verdampfen oder Fällen entfernt, die Rückstände in Wasser, verschiedenen Alkoholen oder Wasser-Alkoholgemischen aufgenommen.

Wurde im Anschluss an eine alkalische Extraktion sauer oder alkalisch hydrolysiert, dann neutralisierte man nach vollendeter Hydrolyse die Lösung und extrahierte meist aus der vorsichtig eingedampften Lösung mit Alkohol. Der Extrakt wurde wiederholt eingedampft und aufgenommen und so konnte man den grössten Teil des Natriumchlorids durch Zentrifugierung entfernen.

4. DIALYSE

Die Dialysen wurden in Cellophanschläuchen gegen laufendes Leitungswasser oder in rotierenden Dialyseschläuchen gegen destilliertes Wasser durchgeführt. Durch die angewandten Dialyseschläuche können gelöste Substanzen mit einem Molekulargewicht bis zu ca. 600 dialysieren.

5. PAPIERCHROMATOGRAPHIE

Es wurde eindimensional und zweidimensional aufsteigend chromatographiert. Als Chromatographiepapier wurden SCHLEIFER & SCHÜLL 2043 b und WHATMANN Nr.1 und Nr.2 verwendet.

Als Lösungsmittel wurden folgende Systeme benutzt:

1. Butanol-Essigsäure-Wasser 4 : 1 : 5;
2. Butanol-Essigsäure-Wasser 4 : 1 : 1;
3. Butanol, mit Wasser gesättigt;
4. Butanol, mit 1 n HCl gesättigt;
5. Phenol, mit Wasser gesättigt;
6. Phenol, mit einer wässrigen Lösung von 6,3 % Natriumetat und 3,7 % NaH_2PO_4 gesättigt.

Für die Entwicklung der Chromatogramme wurden folgende Reagenzien verwendet:

- a) Diazotierte Sulfanilsäure (0,1 g Diazoniumsalz in 20 ml 10 %iger Na_2CO_3 -Lösung) zum Nachweis von Phenolen aromatischen Aminen u. a. kupplungsfähigen Substanzen;
- b) ammoniakalische Silbernitratlösung nach Patridge (64) (für reduzierende Substanzen);
- c) eine 0,25 %ige Lösung von Ninhydrin in Butanol (Nachweis von Aminogruppen);
- d) 0,1 %ige Lösung von 2,6-Dichloro-ochinen-chloroimid in Athanol (u. a. f. p-unsubstituierte Phenole) (65);
- e) 0,1 % o-Nitroso-β-naphthol in Athanol (für p-substituierte Phenole) (66);
- f) 0,1 %ige FeCl_3 -Lösung und
- g) FOLINS Reagenz für phenolische Substanzen;
- h) 0,44 % Kaliumferricyanid in Phosphatpuffer vom pH 7,8 (67) (für Indolring-schliessende Systeme wie Catecholamine u. a.);
- i) Anilinhydrogenphthalat (0,93 g Anilin + 1,66 g Phthalsäure in 100 ml Butanol) für Aldohexosen und Aldopentosen (68) und
- k) eine wässrige Lösung von 1 % Kaliumpermanganat und 2 % Natriumkarbonat für Zucker.

6. VERWENDETE APPARATE

Für die Aufnahme des U. V.-Spektrums:

Zeiss-Spektralphotometer PMQ 11;

für die Aufnahme von IR-Spektren:

PERKIN-ELMAR-Spektralphotometer, Modell 21.

Die Radioaktivitätsbestimmungen wurden in einem

FRIESEKE & HOFFNER-Gerät, Modell FH 149, durchgeführt

für die Messungen auf Plättchen mit Methandurchflusszähler, für die Messungen auf Papierchromatogrammen mit dem Radiopapierchromatographen FIESEKE & HOEPFNER 7452 mit 2 Endfensterzählrohren 7 Hz.

Die papierelektrophoretischen Untersuchungen wurden in einem selbst gebauten Gerät durchgeführt.

7. STICKSTOFF-, KOHLENSTOFF- UND WASSERSTOFFBESTIMMUNGEN

Die Stickstoffbestimmungen wurden im eigenen Institut nach der Kjeldahlmethode durchgeführt. Zur mikroanalytischen C-, H- und N-Bestimmung wurden Proben in das Laboratorium A. Bernhardt/Mühlheim eingeschickt.

8. SÄULENCHROMATOGRAPHIE

Die säulenchromatographischen Versuche wurden in Glassäulen mit einer Länge von 10-30 cm und 0,5-1,5 cm Durchmesser mit BASF-Ultramid K 228 BM 2 und verschiedenen Dowexsorten durchgeführt. Die Eluierung geschah mit Wasser, Methanol, Essigsäure und verschiedenen konzentrierten Gemischen aus den oben angegebenen Lösungsmitteln. Die Lösungsmittel wurden im Eindampftopf nach P. Karlson und E. Hecker entfernt.

9. METHYLIERUNG

Alkalische Cuticulaextrakte wurden mit Salzsäure neutralisiert, eingengt und dann mit Methanol wieder verdünnt. Ein Eindampfen zur Trockne wurde vermieden, um die sauerstoffempfindlichen Substanzen zu schonen. Daher ist es oft nicht möglich, die Konzentration einer Lösung oder die eingesetzte Menge einer Verbindung anzugeben. Die Methylierung wurde mit in Äther gelöstem Diazomethan durchgeführt. Der Überschuss wurde durch Stehenlassen über Nacht und vorsichtiges Erwärmen entfernt.

10. ACETYLIERUNG

Der alkalische Cuticulaextrakt wurde neutralisiert, fast bis zur Trockne eingedampft und in Eisessig aufgenommen. Dann wurden Essigsäureanhydrid auf 100 ml Gesamtlösung und 3 ml Perchlorsäure zugegeben (69). Bei dieser Reaktion musste gekühlt werden. Man liess über Nacht stehen, erwärmte 2 Stunden auf 50-60°C. Die Perchlorsäure wurde mit Kaliumchlorid entfernt.

11. OXYDATION

Alkalische Cuticulaextrakte wurden zum Teil mit Salzsäure auf pH 14 und zum Teil auf pH 10 gebracht. Man gab unter leichtem Erwärmen tropfenweise solange 5 % Kaliumpermanganatlösung hinzu, bis sich die braune Lösung entfärbte oder hellgelb wurde. Das sich dabei bildende Mangandioxyd wurde durch Zentrifugieren entfernt.

12. REDUKTION

Neutralisierte Cuticulaextrakte wurden entweder in Eisessig oder in salzsaurer Lösung bei pH 1 reduziert. Man gab Zinkpulver im Überschuss dazu. Die dabei eintretende Entfärbung der braunen Lösung konnte durch leichtes Erwärmen beschleunigt werden.

Zum Teil wurden nach Abzentrifugieren des überschüssigen Zinks die Lösungen sofort anschliessend hydrolysiert, zum Teil erst eingedampft, mit Alkohol aufgenommen, wiederum eingedampft und dann erst mit 21 % Salzsäure hydrolysiert.

13. HYDROXYLIERUNG

Zu den Cuticulaextrakten wurde eine berechnete Menge Perohydrol gegeben, um die erwünschte Konzentration von 5 % Wasserstoffperoxyd zu erhalten. Bestrahlt wurde mit einer UV-Lampe der Hanauer Quarzlampengesellschaft, die eine Wellenlänge von 280 m hatte.

Die Lösungsschicht in den Reaktionsgefässen soll möglichst dünn sein. Eine Beschleunigung der Reaktion konnte auch durch Rühren erreicht werden.

Wurde mit Wasserstoffperoxyd und Eisessig hydroxyliert, dann dampfte man die Extrakte soweit ein, dass sie gerade noch in Lösung blieben. Dazu oder zu den ganzen Puparien gab man ein Gemisch von 5 Teilen H_2O_2 und von 5 Teilen Eisessig. Man liess dann 6 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Ein Erwärmen erwies sich als ungünstig, weil sich die Lösungen braun färbten. Den Eisessig konnte man im Rotationsverdampfer entfernen.

Bei der Verwendung von Osmiumtetroxyd musste die Reaktionslösung vor der Zugabe des Katalysators in einem Eis-Kochsalzbad vorgekühlt werden. Zu 300 mg Puparien wurden 19 ml einer 5 %igen Wasserstoffperoxydlösung und 1 ml einer 1 %igen OsO_4 -Lösung zugegeben.

Da sich an die Hydroxylierung meist eine Hydrolyse anschloss, wurde durch Zugabe von konz. Salzsäure in die gekühlte Lösung das Wasserstoffperoxyd entfernt.

Bei einem Hydroxylierungsversuch bei pH 7 wurde in einem Quarzglas mit UV bestrahlt, wobei ein Glasrohr aus dem geschlossenen Gefäss in eine Natronlauge-Vorlage führte. Das entstandene Kohlendioxyd wurde als Natriumcarbonat aufgefangen, mit Bariumchlorid als Bariumcarbonat gefällt und die Radioaktivität des letzteren gemessen.

D. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zusammensetzung der Larvencuticula und der Puparien der Schmeissfliege *Calliphora erythrocephala* untersucht und der Chemismus der Sklerotisierung, d.i. die Umwandlung der weissen, weichen Larvencuticula in das harte, braune Puparium, studiert.

Zusammenfassend können folgende Ergebnisse hervorgehoben werden:

1. Bei der Pupariumbildung sinkt der Wassergehalt der Cuticula von 68 % auf 7 %. Die Zunahme des Trockengewichtes um 31 % beruht auf die Einführung der Sklerotisierungssubstanz Acetyl-dopamin sowie eines nicht identifizierten Kohlenhydrats und weiteren Proteins. Der Chitingehalt bleibt unverändert. Durch Extraktion mit Alkali konnte das Chitin von den anderen Komponenten befreit werden.
2. Versuche mit ^{14}C -Tyrosin zeigten, dass im Verlauf der Sklerotisierung Tyrosinmetaboliten fest in die Cuticula eingebaut werden. In den Cuticula weisser Vorpuppen wurde neben Tyrosin N-Acetyl-Dopamin gefunden, das als unmittelbare Vorstufe des sklerotisierenden Chinons anzusehen ist. In 12 Std. alten, eben ausgefärbten Puparien ist selbst nach Extraktion und Hydrolyse kein N-Acetyl-dopamin und auch kein radioaktives Tyrosin mehr nachweisbar.

Die von anderen Autoren isolierten und als Sklerotisierungssubstanz angegebenen Phenole und Phenolcarbonsäuren sind bei *Calliphora* zum Teil auch in eigenen Versuchen gefunden worden. Sie entstehen jedoch nicht erst kurz vor der Verpuppung aus Tyrosin. Para-Diphenole sind nach eigenen Befunden an der Sklerotisierung nicht beteiligt.

3. Durch fraktionierte Extraktionen der Puparien mit NaOH oder durch Säurefällung aus Gesamtextrakten wurden Fraktionen erhalten, in denen die (radioaktiv markierten) Tyrosinmetaboliten besonders stark angereichert sind. Diese Fraktionen enthalten nur 15 % Protein. Den Hauptanteil stellt eine stark sauerstoffhaltige Substanz, sehr wahrscheinlich ein Kohlenhydrat. Durch Hydrolyse konnte das Protein (in welchem die Aminosäuren Arginin, Serin und Threonin fehlen) völlig abgetrennt werden. Die Radioaktivität bleibt an die "Kohlenhydrat-Fraktion" gebunden.
4. Werden Extrakte vor der Hydrolyse hydroxyliert, dann erhält man 4 ninhydrinnegative radioaktive Abbauprodukte, von denen eines isoliert und als Bernsteinsäure identifiziert wurde. Die radioaktive C_4 -Kette beweist die Beteiligung eines chinoiden Me-

taboliten an der Sklerotisierung. Der chinoide Tyrosinmetabolit muss in der sklerotisierten Cuticula 4-fach substituiert sein, wobei wesentliche Bindungen über Aminogruppen entstehen. Das geht aus dem negativen Ausfall der Thiele-Reaktion, aus dem Fehlen der Keto-Gruppe und aus dem Auftreten reichlicher Mengen Ammoniaks bei der Hydrolyse hervor.

5. Aus den geschilderten Versuchen und den in der Literatur enthaltenen Angaben wird geschlossen, dass der chinoide Tyrosinmetabolit in der komplizierten Struktur des Sklerotins für die rotbraune Färbung, die Vernetzung der Cuticula-Komponenten und wahrscheinlich auch für die Bindung an das Chitingerüst verantwortlich ist.

E. LITERATURVERZEICHNIS

1. Richards A.G., Science 109, 591 (1949)
2. Richards A.G., The Integument of Arthropods (1951)
3. Richards A.G., Science 105, 107 (1947)
4. Richards A.G., Science 115, 206 (1952)
5. Butenandt und Karlson,
Z. Naturforsch. 9b, 389 (1954)
6. Becker E. und Plagge E.,
Biol. Zbl. 59, 326 (1939)
7. Karlson P. und Wecker E.,
Z. f. Physiol. Chem., 300, 42 (1955)
8. Franekel G., Proc. Roy. Soc. London, Ser. B 118, 1 (1935)
9. Becker E. und Plagge E.,
Biol. Zbl. 59, 326 (1939)
10. Vogt M., Biol. Zbl. 63, 395 (1943)
11. Possompes B., Arch. Zool. exp. gener. 89, 204 (1953)
12. Karlson P. und Hanser G.,
Z. Naturforsch. 7b, 80 (1952)
13. Karlson P. und Hanser G.,
Z. Naturforsch. 8b, 93 (1953)
14. Hackman R. H., Aust. J. Biol. Sci. 13, 568-577 (1960)
15. Richards A.G., Ergebnisse der Biologie, Band XX (ca. 1957)
16. Richards A.G., und Pipa R. L.
Smithsman, Miscellaneous collections Studies
on the molekular organisation of Insecticuticle
(1959)
17. Wolf L. S., Quart. J. Micr. Sci. 96, 181 (1955)
18. Fraenkel G. und Rudall K. M.,
Proceed Royal. Soc. of London, Ser. B 129, 1-35
(1940)
19. Fraenkel G. und Rudall K. M.,
Proceed Royal. Soc. of London, Ser. B 134, 111
(1947)

20. Hackman R.H., Aust.J. Biol.Sci., 7, 168-178 (1954)
21. Hackman R.H., Aust.J. Biol.Sci., 8, 83-96 (1955)
22. Hackman R.H., Aust.J. Biol.Sci., 8, 530-536 (1955)
23. Trim A.R.H., Biochem.J., 35, 1088 (1941)
24. Hackman R.H., Biochem.J., 54, 362, 367, 371 (1953)
25. Hackman R.H. und Rodd A.R.,
Biochem.J., 54, 362 (1963)
26. Hackman R.H., Aust.J. Biol.Sci., 9, 400-405 (1956)
27. Hackman R.H. und Todd A.R.,
Biochem.J., 55, 631 (1953)
28. Hackman R.H. und Goldberg M.J.,
Ins. Physiol., 2, 221 (1958)
29. Hackman R.H., Proceed. Fourth Int. Congr. of Biochem., 48
(1958)
30. Denell R., Proceed. Roy. Soc. B., 148, 270 (1958)
31. Pryor M.G.M., Proc. Roy. Soc. Sondon, B 128, 378 (1940)
32. Pryor M.G.M., Rusell, P.B. und Todd A.R.,
Biochem.J., 40, 627 (1946)
33. Brunet P.C.J. und Kent P.W.,
Nature 175, 819 (1955)
34. Pryor M.G.M., Rusell P.B., Todd A.R.,
Nature 159, 399 (1947)
35. Schmalfuss H., Heider H. und Winkelmann K.,
Biochem.Z., 257, 188 (1932)
36. Schmalfuss H. und Bussmann G.,
Z. physiol. Chem., 231, 161 (1935)
37. Schmalfuss H., Biochem.Z., 294, 112 (1937)
38. Schmalfuss H. und Müller H.,
Biochem.Z., 183, 362 (1927)
39. Przibram H. und Schmalfuss H.,
Biochem.Z., 187, 467 (1927)
40. Pryor M.G.M., Nature Vol. 175, 600 (1955)
41. Levenbook, Biochem.J., 47, 336 (1950)
42. Gilmour D., The Biochemistry of Insects, Academic Press
(1961)

43. Raper H. S., Biochem. J. 21, 89 (1927)
44. Raper H. S., Physiol. Rev. 8, 245 (1928)
45. Cromartie R. I. T. und Harley-Mason J.,
Biochem. J. 66, 713
46. Bu'Lock J. und Harley-Mason J.,
J. Chem. Soc. 1951, 703
47. Dennell R., Proceed. Royal. Soc. B 149, 187 (1958)
48. Lugg J. W. H., Biochem. J. 32, 775 (1938)
49. Dennell R., Biol. Rev. 33, 178 (1957)
50. Mason H. S., J. Biol. Chem. 172, 83 (1948)
51. Mason H. S., Advances in Encymology 16, 105 (1955)
52. Mason H. S., Nature 175, 771 (1955)
53. Karlson P., Z. f. Physiol. Chem. 318, 194 (1960)
54. Karlson P. und Schweiger A.,
Z. f. physiol. Chem. 323, 199 (1961)
55. Karlson P. und Liebau H.,
Z. Physiol. Chem. 326, 135 (1961)
56. Karlson R., Sekeris C. E. und Sekeris K. E.,
Z. physiol. Chem. 327, 86 (1962)
57. Karlson P. und Sekeris C. E.,
Nature (im Druck)
58. Karlson P. und Sekeris C. E.,
Biochem. Bioph. Acta (im Druck)
59. Karlson P. und Schlossberger-Raecke I.,
Insect. Physiol. (im Druck)
60. Gattermann-Wieland,
235 (1956)
61. Milas N. A., J. Am. Chem. Soc. 59, 541 (1937)
62. Milas N. A., Sussman S.,
J. Am. Chem. Soc. 58, 1302 (1936)
63. Heyns K. und Noack H.,
Ber. 95, 720 (1962)
64. Partridge S. M., Nature 158, 270 (1946)
65. Grengross et al.,
Ber. 66, 435 (1933)

66. Fearon W.O., Biochem.J. 38, 399 (1944)
67. James W.O., Nature 161, 851 (1948)
68. Partridge S.M., Nature 164, 433 (1949)
69. Burton H., Praill R.G.F.,
J. Chem. Soc. 755 (1952)
70. Malek S.R.A., Nature 170, 85 d (1952)
71. Malek S.R.A., Nature 180, 237 (1957)

LEBENS LAUF

Am 4.9.1930 wurde ich als Sohn des Oberregierungsrates Dr. Alfred Laufer und seiner Ehefrau Newena, geb. Kantardjiewa, in Sofia/Bulgarien geboren. 1937 bis 1944 besuchte ich die Deutsche Grund- und Oberschule in Sofia, 1944 bis 1946 die Oberschule in Mühlhausen/Thüringen, 1946 bis 1949 das Realgymnasium in Eschwege/Hessen und ab 1949 das Gymnasium in Stolberg/Rhld. Im Frühjahr 1951 legte ich dort meine Reifeprüfung ab und begann im Sommersemester 1951 mein Chemie- und Medizinstudium an der Universität Bonn. Dort bestand ich im November 1954 die Vordiplomprüfung. Im Jahre 1956 wechselte ich zur Technischen Hochschule Aachen über, wo ich 1958 meine Diplomarbeit fertigstellte und meine Hauptdiplomprüfung ablegte. Meine Doktorarbeit konnte ich im Frühjahr 1959 im Physiologisch-chemischen Institut unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. P. Karlson beginnen. Seit 1. April 1960 bin ich Verwalter einer Assistentenstelle des physiologisch-chemischen Institutes unter der kommissarischen Leitung von Herrn Prof. Dr. P. Karlson.

